

**MIKROELEKTROPHORETISCHE UNTERSUCHUNGEN
ÜBER DIE WIRKUNGEN VON MORPHIN
AUF SPINALE NEURONE DER KATZE**

**MIT BESONDERER BERÜCKSICHTIGUNG
EINER WECHSELWIRKUNG ZWISCHEN MORPHIN UND
NEUROHUMORALEN ÜBERTRÄGERSTOFFEN**

Johannes Bayerl

1977

Aus dem Max-Planck-Institut für Psychiatrie, München

Direktor: Prof. Dr. A. Herz

Abteilung für Neuropharmakologie

Leiter: Prof. Dr. A. Herz

MIKROELEKTROPHORETISCHE UNTERSUCHUNGEN

ÜBER DIE WIRKUNGEN VON MORPHIN

AUF SPINALE NEURONE DER KATZE

Mit besonderer Berücksichtigung einer Wechselwirkung
zwischen Morphin und neurohumoralen Überträgerstoffen

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Johannes Bayerl

aus

Bayreuth

1977

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der Universität München

Berichterstatter:	Priv.-Doz. Dr. W. Zieglgänsberger
Mitberichterstatter:	Prof. G. TenBruggencate
Dekan:	Prof. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 25. 10. 1977



Meinen Eltern

Inhalt

Abkürzungen

I.	E I N L E I T U N G	8
A.	HISTORISCHER HINTERGRUND UND THEMATISCHE EINFÜHRUNG	8
1.	Neurohistologie und Neurophysiologie	8
2.	Mikroelektrophorese	10
3.	Synaptische Überträgerstoffe (Transmitter)	11
a)	L-Glutaminsäure	12
b)	Azetylcholin	12
c)	Glycin	13
B.	AUFGABENSTELLUNG	14
II.	M E T H O D I K	16
A.	MIKROELEKTROPHORESE	16
1.	Einführung	16
2.	Prinzip der Mikroelektrophorese	16
3.	Quantitative Aspekte der Mikroelektrophorese	17
a)	Elektrophorese	17
b)	Elektroosmose	19
c)	De facto Konzentration in Umgebung der untersuchten Nervenzelle	20
4.	Technische Realisation der Mikroelektrophorese	20
B.	ELEKTRODEN	23
1.	Einführung	23
2.	Herstellung der Elektroden	24
a)	Einfachelektroden	24
b)	Wolframdrahtelektroden	24
c)	Mehrfachelektroden	25
3.	Füllen der Mikropipetten	25
4.	Verwendete Substanzlösungen	27
5.	Herstellung der Kombinationselektroden	27
6.	Kontrolle der Mikropipetten	30
C.	ABLEITUNGSTECHNIK UND REIZTECHNIK	30
1.	Intrazelluläre Ableitung	30
2.	Extrazelluläre Ableitung	32
3.	Reiztechnik	33
4.	Aufzeichnung	33
D.	TIERPRÄPARATION	33
E.	BESTIMMUNG DES ABLEITORTES	36

III. E R G E B N I S S E 38

A. WIRKUNGEN VON MORPHIN AUF EXTRAZELLULÄR ABGELEITETE HINTERHORNZELLEN	38
1. Lamina 5 Zellen	38
2. Lamina 4 Zellen	40
3. Vergleich zwischen Levorphanol und Dextrorphan	44
4. Kombination systemischer Gabe von Morphin mit mikroelektrophoretischer Applikation von Naloxon	44
B. WIRKUNGEN VON MORPHIN AUF INTRAZELLULÄR ABGELEITETE SPINALE NEURONE	45
1. Unspezifische Wirkungen	45
2. Wirkungen von Opiaten auf Membranpotential und Membranwiderstand	47
3. Die Wechselwirkung mit vermuteten Überträgerstoffen	47
a) L-Glutaminsäure	47
α) Levorphanol und Dextrorphan	51
β) Beeinflussung des 'Unterschwingens' des Membranpotentials nach L-Glut durch Morphin	53
b) Azetylcholin	53
c) Glycin	53
4. Procain, Atropin und Ca^{2+} -Ionen und ihre Wechselwirkung mit L-Glutaminsäure und Azetylcholin	54
5. Wirkungen von Morphin, Levorphanol und Naloxon auf postsynaptische Potentiale	56
a) monosynaptisches EPSP	56
b) polysynaptisches EPSP	56
c) IPSP	59
6. Lamina 5 Zellen	59
7. Lamina 4 Zellen	60
8. Systemische Gabe von Morphin	63
C. ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE	63

IV. D I S K U S S I O N 65

1. Handelt es sich um spezifische Wirkungen?	65
2. Die Wirkungen von Morphin und postsynaptische Potentiale	66
3. Die Wechselwirkung von Morphin mit Überträgerstoffen	67
4. Präsynaptischer oder postsynaptischer Wirkungsort?	69
5. Die besondere Bedeutung der Lamina 5 Zellen bei der Wirkung von Morphin	70
6. Procain, Atropin und Ca^{2+} -Ionen	71
7. Das Rückenmark als Ort einer Morphinwirkung	72

V. Z U S A M M E N F A S S U N G U N D S C H L U S S - F O L G E R U N G E N 74

Danksagung

Literaturverzeichnis

Lebenslauf

Abkürzungen

ACh	=	Azetylcholin
ATR	=	Atropin
DEX	=	Dextrorphan
EPSP	=	Exzitatorisches postsynaptisches Potential
FEN	=	Fentanyl
L-Glut	=	L-Glutaminsäure
Gly	=	Glycin
IPSP	=	Inhibitorisches postsynaptisches Potential
LEV	=	Levorphanol
MOR	=	Morphin
NAL	=	Naloxon
PROC	=	Procaïn
ZNS	=	Zentralnervensystem
nA	=	Nanoampere
sec	=	Sekunde
min	=	Minute
um	=	Mikrometer
ml	=	Milliliter
mM	=	Millimolar
M Ω	=	Megaohm

I. EINLEITUNG

A. HISTORISCHER HINTERGRUND UND THEMATISCHE EINFÜHRUNG

1. Neurohistologie und Neurophysiologie

Unsere heutigen Vorstellungen über Struktur und Funktion des Nervensystems haben ihre Wurzel im 19. Jahrhundert. Der Streit zwischen den Verfechtern der Neuronentheorie, die die Nervenzellen als selbständige funktionelle und trophische Einheiten auffaßten (His, 1886; Forel, 1887) und denen der Retikulartheorie, die das Nervensystem als zusammenhängendes Netz verstanden (u.a. Gerlach, 1872), dauerte weit bis in dieses Jahrhundert. Die Elektronenmikroskopie war das letzte Glied einer langen Beweiskette für die Richtigkeit der Neuronentheorie: sie konnte zeigen, daß Nervenzellen (bzw. ihre Ausläufer) nicht synzytial miteinander verbunden sind, sondern daß ein enger Spalt (ca. 200 Å) die sogenannte präsynaptische Membran (des einen Neurons) von der postsynaptischen (des anderen) trennt (Palade, 1954; Palay, 1954; De Robertis, 1956). Diesen Kontakt der Nervenzellen untereinander nennen wir seit 1897 nach einem Vorschlag Sherrington's Synapse (vom Griech. *συνάπτεω*).

Gleichzeitig mit diesen neuen morphologischen Erkenntnissen machte die Neurophysiologie durch die Verwendung neuartiger elektronischer Technik in der Erforschung der elektrischen Eigenschaften des Neurons große Fortschritte. Elektrische Phänomene wurden schon sehr früh mit biologischen Mechanismen in Verbindung gebracht. In seinen klassischen Versuchen zeigte Galvani (1791) am Nerv-Muskel-Präparat eines Frosches, daß bei der Nervenleitung Elektrizität eine Rolle spielt. Im Jahre 1848 bewies dann Du-Bois-Reymond den Stromfluß durch Nerven mittels eines Galvanometers.

Adrian (1912) formulierte die "Alles-oder-Nichts-Theorie" der Nervenleitung, die besagt, daß die Information in den Axonen durch zeitliche Aufeinanderfolge kurzer Spitzenpotentiale, der sog. Aktionspotentiale (Spikes), übertragen wird. Aktionspotentiale und Ruhepotentiale der Nervenmembran sind durch ionale Mechanismen verursacht. Durch Versuche an marklosen Riesennervenfasern von Tintenfischen stellten Hodgkin und Huxley (1945, 1952) die Membran-Ionentheorie auf eine exakte quantitative Basis.

Es war lange Zeit eine offene Frage, ob die Informationsübertragung von Neuron zu Neuron an den Synapsen kontinuierlich, d.h. elektrisch, oder unter Zwischenschaltung eines Überträgerstoffes, d.h. chemisch (neurohumoral), vor sich gehe.

Revolutionierend in der Erforschung der Übertragungsmechanismen wirkte die Technik der intrazellulären Ableitung. Eccles (1957, 1964) konnte mit dieser Technik zeigen, daß mit Hemmung (Inhibition) und Erregung (Exzitation) an Synapsen Veränderungen des Membranpotentials der postsynaptischen Membran auftreten. Die Vorgänge an einer exzitatorischen Synapse setzten sich dabei aus folgenden Einzelschritten zusammen: Der ankommende Impuls veranlaßt in den präsynaptischen Endigungen die Freisetzung eines Überträgerstoffes (Neurotransmitter, s. später). Dieser gelangt in den synaptischen Spalt und diffundiert zur postsynaptischen Seite. Hier reagiert der Überträgerstoff mit einem Rezeptorprotein in der Membran. Dadurch werden in der postsynaptischen Membran Ionenkanäle geöffnet, die einen Einstrom von vorwiegend Na^+ -Ionen aus dem Extrazellulärraum in die Zelle und einen etwas geringeren Ausstrom von K^+ -Ionen aus dem Zellinneren verursachen. Als Ergebnis dieses Stromflusses gelangen vermehrt positive Ladungen ins Zellinnere. Dadurch wird das negative Ruhepotential des Zellinneren vermindert. Eine entsprechende Potentialschwankung wird als exzitatorisches postsynaptisches Potential (EPSP) bezeichnet. Summieren sich EPSPs durch die Aktivität mehrerer exzitatorischer Synapsen, so kommt es zu einer verstärkten Depo-

larisation der Membran. Beim Überschreiten der Schwellen-depolarisation für das Auslösen eines Aktionspotentials kommt es zu einer plötzlichen Zunahme der Na^+ -Permeabilität. Analog verlaufen die Vorgänge an einer inhibitorischen Synapse: Die präsynaptischen Endigungen setzen aus synaptischen Vesikeln einen inhibitorischen Transmitter frei. Dieser reagiert mit seinem spezifischen Rezeptor auf der postsynaptischen Membran und verändert deren Permeabilität vorwiegend für Cl^- -Ionen, wodurch sich eine reversible Potentialverschiebung in Richtung Negativität ergibt, die als inhibitorisches postsynaptisches Potential (IPSP) bezeichnet wird und die Auslösung von Aktionspotentialen erschwert oder verhindert.

2. Mikroelektrophorese

Durch die Kombination intrazellulärer Ableitungstechnik mit extrazellulärer Mikroelektrophorese ist es möglich, eine chemische Substanz (z.B. ein vermuteter Überträgerstoff oder eine pharmakologisch wirksame Substanz) relativ selektiv und in kleinen Mengen auf die Membran einer Nervenzelle zu applizieren. Trotz einiger schwerwiegender technischer Einschränkungen ist diese Technik zur Erforschung der bioelektrischen Signale des Einzelneurons in Abhängigkeit physiologischer und pharmakologischer Wirksubstanzen von großem Nutzen. Über erste Versuche in Richtung einer lokalisierten Applikation berichtete bereits Langley (1907). Er applizierte mit Hilfe feiner Glaskapillaren Nikotin auf Muskelfasern. Die heutige Form der Mikroelektrophorese wurde von Nastuk (1953) und unabhängig von Del Castillo und Katz (1955) entwickelt. Mit Hilfe des elektrischen Stroms werden kleinste Substanzmengen aus dünnen Glaskapillaren freigesetzt. Die oben genannten Autoren benutzten diese Methode, um synaptische Übertragungsvorgänge an der motorischen Endplatte zu studieren.

3. Synaptische Überträgerstoffe (Transmitter)

Von verschiedenen Forschergruppen wurde in den letzten 20 Jahren ein Katalog von Kriterien aufgestellt, die eine biologisch aktive Substanz als Überträgerstoff (Transmitter) charakterisieren soll (Florey, 1960; Terzuolo und Edwards, 1962; McLennan, 1963; Werman, 1966; Bloom und Giarman, 1968; Steiner, 1971). Die wichtigsten Kriterien sind: 1) Die vermutete Überträgersubstanz muß in dem betreffenden Teil des Zentralnervensystems vorkommen, 2) entsprechende Enzyme für Synthese und Abbau dieser Substanz müssen vorhanden sein, 3) die Substanz muß aus den präsynaptischen Terminalen freigesetzt werden, 4) nach Freisetzung durch präsynaptische Reizungen und nach elektrophoretischer Applikation müssen an der postsynaptischen Membran identische ionale Mechanismen hervorgerufen werden. Die recht gut erforschten Übertragungsmechanismen an der Muskelendplatte (Übersicht s. Katz, 1966) dürfen nur bedingt als Modell für andere neurohumorale Übertragungsvorgänge angesehen werden. Die Bedeutung der einzelnen Neurotransmitter im Zentralnervensystem (ZNS) ist weit weniger gut überschaubar, da durch die morphologische Komplexität des ZNS sich eine Reihe methodischer Schwierigkeiten ergeben. So lassen sich für die im ZNS vermuteten Transmitter mit heutigen Methoden nur ein Teil der oben genannten Kriterien erfüllen.

Eine Reihe von Pharmaka entfalten ihre Wirkung über eine Interaktion mit vermuteten Neurotransmittern. Diese Möglichkeit einer Interaktion wird auch bei den Wirkungen von Opiaten am ZNS diskutiert. Die Überträgersubstanzen, mit denen in unseren Experimenten eine Wechselwirkung mit Opiaten untersucht wurde, waren folgende:

a) L-Glutaminsäure

Diese Aminosäure ist als Baustein im intermediären Stoffwechsel seit langem bekannt. Eine Synopsis von Ergebnissen der Neurochemie, Neuroanatomie, Neurophysiologie und Neuropharmakologie machen es heute sehr wahrscheinlich, daß bestimmte Aminosäuren auch als Überträgerstoffe an Synapsen wirken (s. folgende Übersichtsarbeiten: Curtis und Watkins, 1965; Werman, 1972; Curtis und Johnston, 1974; Krnjević, 1970, 1974).

L-Glutaminsäure (L-Glut) stellt sich als eine der Hauptanwärter für einen exzitatorischen Überträgerstoff dar und scheint in verschiedenen Strukturen des ZNS eine Rolle als exzitatorischer Transmitter zu spielen (s. Krnjević, 1974). Spinale Neurone von Katzen stellen sich aufgrund neurochemischer Untersuchungen über die unterschiedliche Verteilung von Aminosäuren in den Hinter- und Vorderwurzeln (Graham et al., 1967) als sehr wahrscheinliche Kandidaten einer glutaminergen Übertragung dar.

L-Glutaminsäure bewirkt an der postsynaptischen Membran eine Membrandepolarisation und eine Zunahme der Membranleitfähigkeit, vermutlich vorwiegend für Na^+ -Ionen. Frühere Untersuchungen haben ergeben, daß die Gleichgewichtspotentiale ($E_{\text{L-Glut}}$) für diese Substanzwirkung und das Gleichgewichtspotential für das exzitatorische postsynaptische Potential (E_{EPSP}) nahe beieinanderliegen (Zieglgänsberger und Puil, 1973). Somit erfüllt L-Glutaminsäure ein weiteres Kriterium für einen exzitatorischen Transmitter.

b) Azetylcholin

Azetylcholin (ACh) ist ein gesicherter Überträger im autonomen Nervensystem und an der Muskulatur (Krnjević, 1974). Bei den Wirkungen von ACh werden nikotinische und muskarinische Mechanismen unterschieden.

Nikotinische Wirkungen zeigen bei phoretischer Applikation üblicherweise einen raschen Wirkungseintritt und sind kurzdauernd; sie sind blockierbar durch Curare und einen Überschuß von Nikotin. Muskarinische Wirkungen zeigen hingegen bei phoretischer Applikation einen langsamen Wirkungseintritt und sind längerdauernd; sie sind durch Atropin blockierbar.

Da ACh und entsprechende Enzyme in verschiedenen Abschnitten des ZNS vorkommen (MacIntosh, 1941; Feldberg, 1945; Feldberg und Vogt, 1948; Burgen und Chipman, 1951; Hebb, 1955; Hebb und Silver, 1956; Crossland, 1960; Hebb und Krnjević, 1962; Whittaker, 1963; Ryall et al., 1964; Heilbronn und Winter, 1970; Kasa et al., 1970; Burt, 1971; Pepeu, 1972), wurde ACh schon als möglicher ZNS-Transmitter vermutet bevor stichhaltige Beweise vorlagen. Curtis und Mitarb. (1961 und 1966) gelang es zu zeigen, daß ACh an Renshawzellen als Überträgerstoff mit einem vorwiegend nikotinischen Mechanismus wirkt. Einschränkend ist zu sagen, daß viele Neurone gemischte Rezeptorpopulationen (nikotinische und muskarinische) besitzen, welche den Wert der Dale'schen Einteilung in nikotinische und muskarinische Wirkungen relativieren. Krnjević und Mitarb. (1971) haben an corticalen Zellen einen cholinergen Mechanismus untersucht, der vorwiegend als muskarinisch zu bezeichnen ist. Vergleichbare Untersuchungen an spinalen Neuronen der Katze (Zieglängsberger und Reiter, 1974) haben ferner bestätigt, daß ACh auch im Rückenmark durch einen sehr ähnlichen Mechanismus - nämlich durch eine Abnahme der K^+ -Leitfähigkeit - wirkt.

Die hier untersuchten Opiatwirkungen berücksichtigen insbesondere die Ergebnisse letztgenannter Arbeit.

c) Glycin

Werman und Mitarb. (1967) zeigten, daß mikroelektrophoretisch appliziertes Glycin (Gly) an spinalen Motoneuronen Hyperpolarisation mit erhöhter Membranleitfähigkeit für Cl^- erzeugte, d.h. es ruft an der postsynaptischen

Membran die Membranveränderungen hervor, die ein IPSP charakterisieren. Das Gleichgewichtspotential (E_{Gly}) dieses Effektes lag nahe dem Gleichgewichtspotential für das IPSP (E_{IPSP}). Es konnte weiterhin gezeigt werden, daß Gly an vielen anderen Neuronenpopulationen im Rückenmark als postsynaptisch hemmender Transmitter wirkt (siehe Curtis und Johnston, 1974).

B. AUFGABENSTELLUNG

Die Mechanismen, durch die Opiate ihre Wirkungen am Zentralnervensystem entfalten, sind noch weitgehend ungeklärt. Es gibt Hinweise, daß Überträgersubstanzen dabei - im Sinne einer Wechselwirkung mit Opiaten - von Bedeutung sein könnten.

Mit der hier angewandten Technik, nämlich der Kombination mikroelektrophoretischer Applikation mit extra- und vor allem intrazellulärer Ableitung, sollte eine solche Interaktion zwischen Morphin und vermuteten Überträgern (L-Glut, ACh, Gly) "in vivo" näher untersucht werden. Ferner sollte der Einfluß von Morphin auf postsynaptische Potentiale geprüft werden. Da unspezifische Effekte von Morphin bekannt sind, sollten die Wirkungen von Morphin in besonderem Maße auf ihre Spezifität getestet werden, d.h. sie müßten durch mikroelektrophoretische Applikation des Antagonisten Naloxon antagonisierbar sein. Naloxon besitzt keine agonistischen Effekte zu Morphin. Vergleichende Untersuchungen zu den Wirkungen von mikroelektrophoretisch appliziertem Procain, Atropin und Ca^{2+} -Ionen wurden u.a. miteinbezogen, um die Spezifität der Opiatwirkungen stärker abzugrenzen. Weiterhin sollte geprüft werden, ob sich

die postulierte Stereospezifität der Morphinrezeptoren auch mit mikroelektrophoretischer Technik zeigen läßt; für diese Untersuchung diente der Wirkungsvergleich zwischen dem Opiat Levorphanol und seinem (+)Isomer Dextrorphan, das keine analgetischen Wirkungen besitzt.

Die Experimente sollten die Rolle, die das Rückenmark als Ort für eine Morphin-Wirkung spielt, erhellen. Dabei wurde vorgesehen, die Wirkungen systemischer und mikroelektrophoretischer Gabe von Morphin auf spinale Neurone an spinalisierten und an intakten Tieren zu vergleichen und ihre Antagonisierbarkeit durch mikroelektrophoretische Applikation von Naloxon zu prüfen. Es wurde von Motoneuronen, die den Vorzug besonders stabiler Ableitverhältnisse boten, von Interneuronen und von Hinterhornzellen der 6. und 7. Lumbalsegmente abgeleitet.

Neurophysiologische Untersuchungen haben gezeigt, daß das Hinterhorn im Rückenmark der Katze eine funktionelle laminäre Struktur besitzt (Wall, 1967), die in etwa auch einer histologischen nach Rexed (1952) entspricht. Dabei haben Zellen einer bestimmten Schicht, der sog. Lamina 5, eine besondere Bedeutung für die neuronale Verarbeitung von Schmerzreizen. In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb an einer Anzahl von Neuronen geprüft, ob Lamina 5 Zellen im Vergleich zu Lamina 4 Zellen, die Information von leichten Berührungsreizen verarbeiten, unterschiedliche Reaktionsweisen und Empfindlichkeiten gegenüber einer Applikation von Morphin zeigen.

II. M E T H O D I K

A. MIKROELEKTROPHORESE

1. Einführung

Die Mikroelektrophorese ermöglicht die Applikation von Substanzen in die unmittelbare Umgebung von Nervenzellen. Diese Technik ist herkömmlichen Applikationsformen überlegen, da

- die Substanz die Blut-Hirnschranke umgeht,
- kleinste Mengen wiederholbar appliziert werden können,
- der Effekt mit bestimmten Nervenzellen korreliert werden kann.

Mit dieser Technik kann der physiologische Vorgang der Freisetzung einer Überträgersubstanz an einer Synapse "in vivo" nachgeahmt werden und somit Aufschlüsse über die Mechanismen neurohumoraler Übertragung gewonnen werden. Weiterhin kann die Wirkung pharmakologischer Substanzen direkt an der Nervenzelle registriert werden und die damit ermöglichte systematische Untersuchung von agonistisch und antagonistisch wirkenden Substanzen kann zur Aufklärung und Klassifizierung physiologischer und pharmakologischer Wirkungen an Synapsen dienen.

2. Prinzip der Mikroelektrophorese

Unter Elektrophorese versteht man die relative Bewegung gelösten oder suspendierten Materials zur stationären Flüssigkeit, verursacht durch ein angelegtes elektrisches Feld. Die Elektrophorese ist eines der vier elektrokinetischen Phänomene, die bei der relativen Bewegung zwischen festen und mobilen Teilen einer elektrischen Doppelschicht

auftreten. Von den weiteren elektrokinetischen Phänomenen Elektroosmose, Sedimentationspotential und Strömungspotential ist für die verwendete Versuchstechnik lediglich die Elektroosmose von Bedeutung. Die Oberflächenladung der Substanzen, als Voraussetzung einer Materialbewegung im elektrischen Feld, kann durch Ionisation, Ionenabsorption oder Ionendissolution aufgebaut werden (Shaw, 1969). Bei der Mikroelektrophorese spielt dabei die Ionisation (z.B. bei Aminosäuren durch Wahl eines geeigneten pH-Wertes) die Hauptrolle. An die Mikropipette wird ein Gleichstrom angelegt, wodurch entsprechend geladene Ionen aus der Pipettenspitze austreten. Die Polarität des Gleichstroms richtet sich nach der Ladung der auszutreibenden Ionenart (s. Abb. 1).

3. Quantitative Aspekte der Mikroelektrophorese

a) Elektrophorese

Bei vollständig ionisierter Lösung läßt sich die Zahl der freigesetzten Ionen durch das II. Faraday'sche Gesetz bestimmen:

$$M_i = \frac{T_n \cdot i}{z \cdot F} \text{ (Mol/sec)}$$

T_n = Transportzahl

M_i = Ionenstrom (Mol/sec)

i = Strom

F = Faraday Konstante

z = Wertigkeit des Ions

Der Strom kann mittels eines Galvanometers gemessen und somit die freigesetzte Ionenmenge bestimmt werden. Diese Gleichung beschreibt allerdings einen idealisierten Fall; denn im konkreten Versuch wirken u.a. folgende Störfaktoren ein:

- fixierte Ladungen an der Kapillarwand,
- Mobilität der Ionen,
- Ausbildung semipermeabler Membranen durch Gewebspartikel oder Substanzkristalle an der Pipettenspitze.

Das bedeutet, daß bei gleichem Gesamtstromfluß eine de facto erniedrigte Freisetzung der entsprechenden Ionenart auf-

Abb. 1

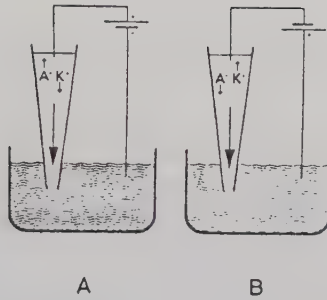


Abb. 1: Schema der Mikroelektrophorese (nach Steiner, 1971)

Je nach unterschiedlicher Polung werden entweder die

A) Kationen (K^+) oder die

B) Anionen (A^-) ausgestoßen.

tritt. Es wurde aber gezeigt, daß die freigesetzte Menge für eine Substanzlösung charakteristisch und dem elektrischen Strom proportional ist (Krnjević und Phillis, 1963; Zieglgänsberger et al., 1969).

b) Elektroosmose

Wie oben bereits erwähnt, wird ein Teil der Ionen auch durch Elektroosmose freigesetzt. Die Elektroosmose, verstanden als relative Bewegung einer Flüssigkeit zu einer stationären, geladenen Oberfläche (z.B. Kapillarwand) ist also der Elektrophorese komplementär. Sie ist von verschiedenen Faktoren abhängig, dem sogenannten Zetapotential, einem Potential, das sich zwischen Kapillarwand und Lösung aufbaut, von Konzentration und Viskosität der Lösung, sowie vom Spitzendurchmesser der Kapillare. Nach Adamson (1960) läßt sich der elektroosmotische Flüssigkeitsstrom mit folgender Formel quantitativ beschreiben:

$$V = \frac{\int \cdot r^2 \cdot \epsilon \cdot E}{4 \cdot \eta \cdot l \cdot 300^{-2}} \quad V$$

$\int$ = Potential zwischen Kapillarwand und Flüssigkeit
 r = Radius des Rohres
 l = Länge des Rohres
 ϵ = Die Elektrizitätskonstante des Lösungsmittels
 E = angelegtes Potential
 η = Viskositätskoeffizient der Lösung
 300^{-2} = Umrechnungsfaktor von elektrostatischen Einheiten auf Volt

Wenn man u für die elektroosmotische Mobilität einsetzt, erhält man vereinfacht:

$$V = \frac{\pi \cdot r^2 \cdot u \cdot E}{l} \quad (\text{ml/sec}) \quad u = \text{cm/Volt} \cdot \text{sec}$$

Betrachtet man die Elektrodenspitze als Zylinder, dann erhält man:

$$V = u \cdot i \cdot \int \quad (\text{ml/sec})$$

$\int$ = spezif. Widerstand der Lösung
 i = Strommenge

Daraus folgt für den elektroosmotischen Flüssigkeitsstrom:

$$M_{\text{osm.}} = u \cdot i \cdot c \cdot 10^{-3} \text{ (Mol/sec)}$$

Die Freisetzungsrates einer Substanz setzt sich also aus elektrophoretischem und elektroosmotischem Anteil zusammen.

c) De facto Konzentration in Umgebung der untersuchten Nervenzelle

Da sich der elektroosmotische Anteil schwer vorab berechnen läßt, wurden die Freisetzungsrates experimentell durch "in vitro"-Messungen mit Hilfe radioaktiv markierter Substanzen bestimmt (Krnjević und Phillis, 1963; Curtis, 1964; Zieglgänsberger et al., 1969). Auf die in diesem Labor ermittelten Daten über die Faktoren, die auf die Freisetzungsrates Einfluß nehmen (Alterung der Pipetten, Haltestrom, pH, etc.) wurde zurückgegriffen (Zieglgänsberger, Sothmann und Herz, 1974).

Für die Wirkung einer Substanz ist natürlich die Konzentration, die an der Zelle selbst erreicht wird, maßgebend. Eine näherungsweise Bestimmung dieser Konzentration war durch genauere Analyse der Diffusionswege möglich, wie sie in diesem Labor durchgeführt wurde (Herz, Zieglgänsberger und Färber, 1969).

4. Technische Realisation der Mikroelektrophorese

Als Energiequelle für die Mikroelektrophorese dienten Batterien. Durch einen elektrischen Schaltkreis (s. Abb. 2) wurde der Stromfluß, der in Dauer und Größe wählbar war, unabhängig vom Elektrodenwiderstand konstant gehalten. Bei dem verwendeten vierkanaligen Phoresegerät war eine automatische Vorwahl der Applikationsdauer zuschaltbar. Die Größe des Phoresestromes konnte für jeden Kanal am Gerät abgelesen werden. Zusätzlich wurde bei der von uns verwendeten Anordnung die Spannung, die notwendig war, den Phoresestrom zu speisen, an-

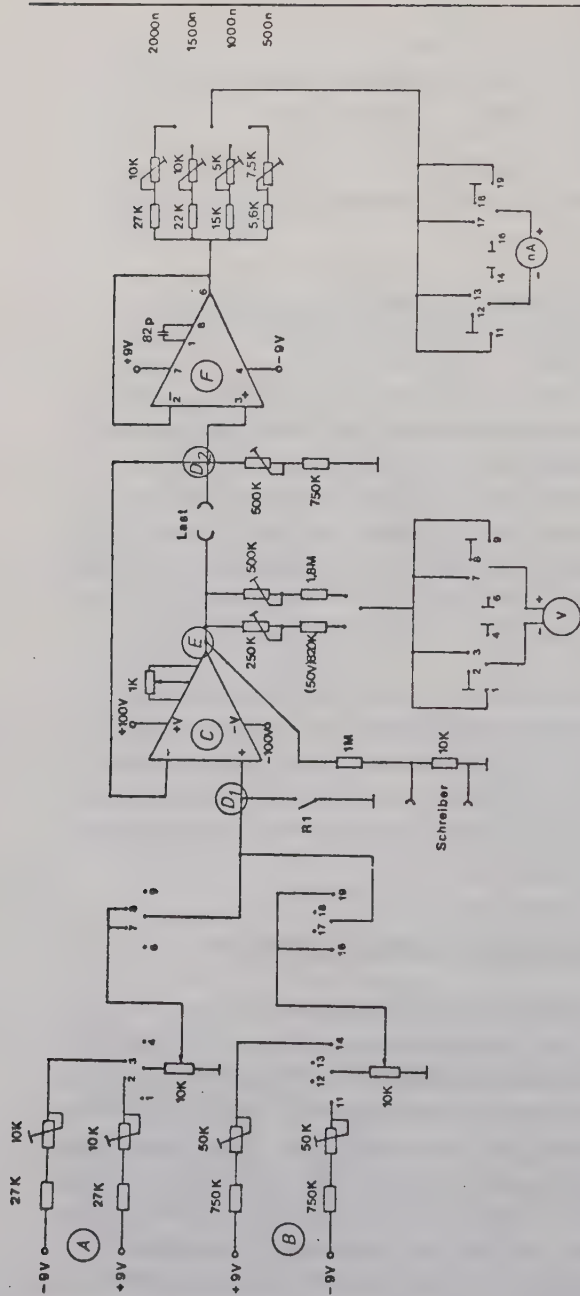


Abb. 2

Schaltschema eines Kanals des Mikroelektrophoresegerätes

Abb. 2: Schaltschema eines Kanals des Mikroelektrophorese-
gerätes

Das Prinzip des Gerätes beruht auf einer Strom-Serien-Gegenkopplung. Die Stromkonstanz wird durch Nachregelung der Ausgangsspannung, entsprechend den Änderungen des Elektrodenwiderstandes = -(Last)-, gewährleistet.

A Phoresestrom; 2 V = 2000 nA.

B Haltestrom; 50 mV = 50 nA.

C Hochvoltverstärker (Phillbrick, 1022).

D₁ und D₂ werden auf gleichem Spannungsniveau gehalten.

E Die hier auftretenden Widerstandsänderungen werden bei V als Spannungsausschläge angezeigt.

F Der Operationsverstärker (LM 208) dient zur Anzeige der nA-Größe des Phoresestromes.

-(Last)- : Mikroelektrode.

Für weitere Details sei auf elektronische Fachliteratur verwiesen.

gezeigt. Bei Spannungssoszillationen wurde auf Unregelmäßigkeiten der Freisetzungsrates geschlossen, die einwandfreie Verwertbarkeit einer solchen Applikation als nicht gewährleistet angesehen und deren Ergebnisse wurden verworfen. Ein Haltestrom (backing voltage) wurde nur gelegentlich angewandt, da eine nachfolgende Applikation durch in die Pipette "gesaugte" Ionen stark beeinträchtigt würde (Zieglgänsberger et al., 1974).

Bedeutsam für die Auswertung war die Elimination von Stromeffekten. Anionischer Strom besitzt die Eigenschaft, eine Nervenzelle exzitatorisch zu beeinflussen, ein kationischer wirkt dagegen depressorisch. Derartige Stromeffekte müssen von Substanzeffekten, mit denen sie gelegentlich stark interferieren können, differenziert werden. Zumeist konnte dies schon aufgrund des schnellen Einsetzens und Abbrechens von Stromeffekten gegenüber Substanzeffekten geschehen. Darüber hinaus arbeiteten wir oft mit einer sogenannten Stromkompensation, d.h. es wurde ein gleich großer, aber entgegengesetzt gepolter Strom gleichzeitig durch ein danebenliegendes kochsalzgefülltes Röhrchen appliziert (s.a. Salmoiraghi und Stefani, 1967; Zieglgänsberger und Puil, 1973). Diese Anordnung schloß derartige Stromeffekte aus.

B. ELEKTRODEN

1. Einführung

Die Elektroden bzw. Mikropipetten erfüllen zwei Aufgaben: a) aus ihnen erfolgt die Applikation der Substanz (s. unter Mikroelektrophorese) und b) sie dienen zur Registrierung der bioelektrischen Signale der Zelle. Bei den hier durchgeführten Versuchen wurden verschiedene Typen von Mikroelektroden verwendet:

- zur intrazellulären Registrierung diente entweder eine gerade einläufige oder doppelläufige Glaselektrode;
- zur extrazellulären Ableitung diente eine Wolframdraht-Elektrode, die besonders gute elektrische Eigenschaften (niedriges Hintergrundrauschen) aufwies;
- zur Applikation diente eine dreikanulige Mehrfachelektrode, wie sie in diesem Labor entwickelt wurde (Herz et al., 1969).

2. Herstellung der Elektroden

Das Grundmaterial bestand aus Röhrchen aus Pyrexglas (Plowden & Thompson, Stourbridge, England).

a) Einfachelektroden

Die Einfachelektroden wurden aus Glasröhrchen hergestellt, deren Außendurchmesser 3,0 mm und deren Innendurchmesser 2,7 mm betrug. Nach sorgfältiger Reinigung mit Alkohol-Chromschwefelsäure wurden die Röhrchen getrocknet und daraufhin in einem vertikalen Elektrodenziehgerät (nach Winsbury) die Spitzen ausgezogen. Bei diesem Vorgang wurde die Glaskapillare durch eine elektrisch aufgeheizte Glühwendel erwärmt und anschließend mit einem elektronisch gesteuerten Magneten auseinandergezogen. Je nach Einstellung der Temperatur und Magnetstärke konnte die Form und Länge der Spitze variiert werden. Der Spitzendurchmesser der Einfachelektroden betrug 0,5 - 1,5 μm (Einzelheiten s. Curtis, 1964).

b) Wolframdrahtelektroden

Bei der Herstellung der Wolframdraht-Elektrode wurde eine Glaskapillare auf 2 - 3 μm Spitzendurchmesser abgebrochen und ein elektrolytisch geschärfter Wolframdraht mit Hilfe eines Mikromanipulators durch die Kapillare geschoben, bis die Spitze des Drahtes aus der Elektrodenspitze 4 - 7 μm

herausragte (für Details s. Levick, 1972; Fries und Zieglsberger, 1974).

c) Mehrfachelektroden

Der Durchmesser der für die Mehrfachelektroden verwendeten Glasröhrchen betrug außen 1,5 mm, innen 1,0 mm. Nach Reinigung und Trocknung wurden je drei, ca. 10 cm lange Röhrchen mit Messingringen zusammengefaßt und verklebt (mit UHU-Plus). Das Ausziehen der Spitzen erfolgte nach dem gleichen Prinzip wie bei den Einfeldelektroden, wobei hier jedoch während des Schmelzens das Röhrchenbündel um seine Längsachse gedreht wurde, damit die einzelnen Röhrchen gut aneinanderschmolzen (s. Abb. 3). Nachfolgend wurden die Spitzen der Mehrfachelektroden unter dem Mikroskop auf ca. 2 - 3 μm Durchmesser abgebrochen und mittels einer Glühwendel gebogen (Einzelheiten s. Herz et al., 1969).

3. Füllen der Mikropipetten

Meist wurde eine indirekte Füllmethode angewandt: die Mikropipetten wurden in aqua dest. kurz gekocht, dann abgekühlt; sie füllten sich dabei mit Flüssigkeit. Dann wurde die aqua dest. bis über den Spitzenhals abgesaugt und die entsprechende Substanzlösung mittels einer dünnen Kanüle durch einen Membranfilter (Porengröße 0,2 μm) in die Mikropipette injiziert. Danach wurden die Elektroden senkrecht mit der Spitze in aqua dest. eingetaucht und aufbewahrt. Durch Diffusion wurden die Substanzlösungen langsam in die Spitze transportiert. Die Mindestdiffusionszeit betrug dabei 10 Stunden. In der Regel wurden die Elektroden am Vortag des Versuches gefüllt.

Zum schnellen Füllen mit empfindlichen Substanzen (z.B. Acetylcholin) wurden sog. Theta-Elektroden verwendet, d.h. Elektroden mit einer Scheidewand. Die Flüssigkeit wurde hier durch Kapillarkräfte in die Spitzen gesogen und diese Pipetten waren sofort gebrauchsfähig.

Abb. 3

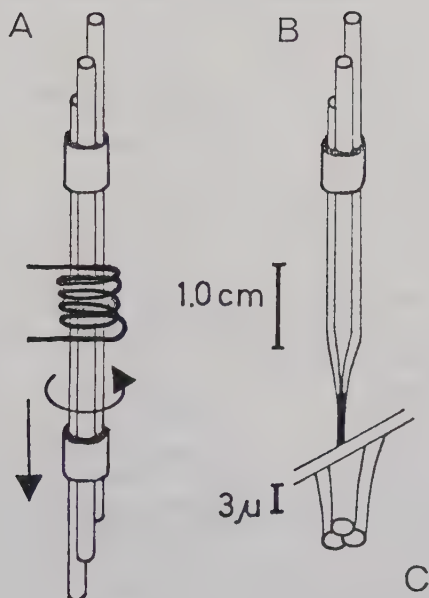


Abb. 3: Schematische Darstellung des Ziehens der Mehrfach-
elektroden

- A) Elektrodenrohling mit Heizspirale. Die beiden Pfeile geben die Dreh- bzw. Zugrichtung an.
- B) Die gezogene Elektrode (jeweils zwei Stück aus A).
- C) Elektrodenspitze in stark vergrößertem Maßstab.

4. Verwendete Substanzlösungen

Die Ableitelektrode wurde mit Kaliumcitrat (1,6 M) und Kaliumchlorid (1 M) im Verhältnis 10 : 1 gefüllt. Folgende Substanzen wurden aus den Mehrfachelektroden mikroelektrophoretisch appliziert:

Atropin-sulfat (ATR)	50 mM in 165 mM NaCl-Lösung	pH 5,0
Azetylcholin (ACh)	0,5 M und 1 M	pH 5,0
Calcium-chlorid (Ca^{2+})	1 M	pH 5,0
Dextrorphan-tartrat (DEX)	50 mM in 165 mM NaCl-Lösung	pH 5,0
Glycin (Gly)	1 M	pH 5,0
Levorphanol-tartrat (LEV)	50 mM in 165 mM NaCl-Lösung	pH 5,0
Mono-Na-L-glutamat (L-Glut)	3 M	pH 8,0
Morphin-sulfat (MOR)	50 mM in 165 mM NaCl-Lösung	pH 5,0
Naloxon-HCl (NAL)	50 mM in 165 mM NaCl-Lösung	pH 5,0
Procaïn-HCl (PROC)	50 mM in 165 mM NaCl-Lösung	pH 5,0

5. Herstellung der Kombinationselektroden

Die Einfachelektrode wurde mit der an der Spitze gebogenen Mehrfachelektrode in der Weise mit Epoxiharz zusammengeklebt, daß die Einfachelektrode die Mehrfachpipette um 70-120 μm überragte. Da Epoxiharz dem Nervengewebe schaden könnte und deshalb die Elektroden spitze einige Millimeter unverklebt belassen wurde, verklebten wir zum besseren Zusammenhalt die Pipetten zusätzlich an den "Schultern" mit Wachs (Deiberit^R) (s. Abb. 4).

Die Wolframdraht-Elektrode für die extrazelluläre Ableitung wurde in gleicher Weise mit der Mehrfachpipette Seite an Seite verklebt (Separation: 10 - 20 μm). Die Abb. 5

Abb. 4

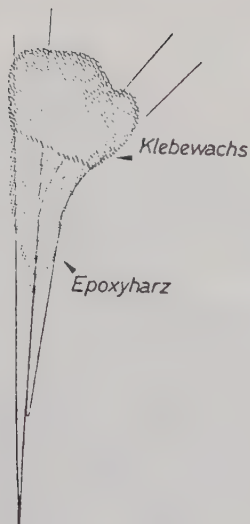


Abb. 4: zeigt schematisch die zusammengeklebte Kombinationselektrode

Die gerade Elektrode überragte die Mehrfachpipette um 70 - 120 μm .

Die Spitze der Kombinationselektrode blieb unverklebt.

Abb. 5

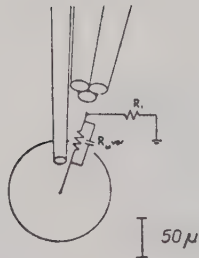


Abb. 5: Schematisches Bild einer Kombinationselektrode in situ (nach Zieglängsberger und Puil, 1973)

Die Ableitelektrode liegt intrazellulär. Die zurückversetzte Dreifachpipette dient zur extrazellulären Applikation der Substanzen.

R_m symbolisiert den Membranwiderstand, R_e den Widerstand des umgebenden Nervengewebes, von dem man annimmt, daß er während der Applikation verhältnismäßig konstant bleibt.

zeigt schematisch eine intrazelluläre Kombinationselektrode "in situ".

6. Kontrolle der Mikropipetten

a) Die Mikropipetten wurden vor Gebrauch optisch unter dem Mikroskop geprüft. Bei Verunreinigungen, Kristallbildung, Luftblasen etc. wurden die Elektroden nicht verwendet.

b) Die elektrische Widerstandsmessung, mit Gleichstrom oder bei verschiedenen Frequenzen als Spannungsabfall über der Elektrode bestimmt, diente zur weiteren Überprüfung des Zustands der Elektrode (s. Abb. 6). Die dabei tolerierten Werte für die Ableitelektrode lagen bei 10 - 20 M Ω , für die Substanzröhrchen bei 20 - 50 M Ω und für die Wolframdrahtelektroden bei 0,5 - 1,5 M Ω .

C. ABLEITUNGSTECHNIK UND REIZTECHNIK

1. Intrazellulär Ableitung

Der hohe Widerstand der Mikroelektroden (20 - 30 M Ω) bedingt, daß die kleinen elektrischen Signale der Zelle verstärkt werden mußten, um Auslenkungen am Kathodenstrahloszillographen (Tektronix D 13, Dual beam) zu erzeugen. Dazu diente ein Elektrometerverstärker mit Feldeffekttransistoreingang (WPI, M 701, WP-Instruments, Hamden) mit folgenden Eigenschaften: Eingangswiderstand: $2 \cdot 10^5$ M Ω , Leckstrom max. 10^{-12} A. Mikroelektroden besitzen nicht nur einen Ohmschen Widerstand, sondern infolge der Kapazität des dünneren Teils der Glasmikroelektroden (unterhalb des Schafts) auch einen Wechselstromwiderstand. Dadurch kann es zu erheblichen Signalverzerrungen kommen. Dieser kapazitative Verlust wurde durch eine rückgekoppelte Kapazitätskompensation im

Abb. 6

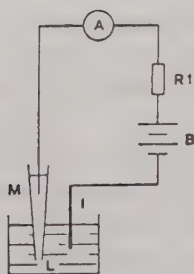


Abb. 6: Elektrische Kontrolle der Mikropipetten
(Schematisch nach Steiner, 1971)

Die Widerstandsmessung der Mikropipette in einer Elektrolytlösung mittels Gleichstrom:

- (B) Batterie
- (R₁) Serienwiderstand
- (M) Mikropipette
- (L) Elektrolytlösung
- (I) Indifferente Elektrode

Verstärkereingang nahezu vollständig korrigiert.

Um den Widerstand der Zellmembran zu messen, bedienen wir uns hyperpolarisierender Testpulse, deren Dauer länger als die Membran-Zeit-Konstante war (meist 20 msec, 2 - 20 nA). Durch diese intrazellulären negativen Stromstöße wird das Membranpotential proportional ausgelenkt. Dabei besteht im hyperpolarisierenden Bereich meist eine lineare Strom-Spannungsabhängigkeit, so daß sich über das Ohm'sche Gesetz der Membranwiderstand errechnen läßt. Bei einläufigen Ableitelektroden wurde dabei mit dem Prinzip einer Wheatstoneschen Brückenschaltung gearbeitet und bei Doppелеlektroden wurde direkt über das verbleibende Röhrchen Strom intrazellulär injiziert. Mittels dieser Technik war es möglich, Membranpotential, Membranwiderstand, exzitatorische und inhibitorische postsynaptische Potentiale (EPSP und IPSP) und Gleichgewichtspotentiale zu bestimmen.

Zur Bestimmung der durch intrazelluläre Strominjektion gewonnenen Daten verwendeten wir eine graphische Methode, wie sie von Ginsborg (1967) angegeben worden ist. Dabei werden die entsprechenden Werte in ein Strom/Spannungs Diagramm aufgetragen. Die Anstiegssteilheiten der Geraden geben hier ein Maß für den Widerstand bzw. die Leitfähigkeit der Membran (s. die Abb. 9, 11, 12). Die Schnittpunkte jeweiliger Widerstandskurven einer applizierten Substanz mit der Kontrollkurve ergeben das Equilibriumspotential dieser Substanz (s. die Abb. 12).

2. Extrazelluläre Ableitung

Bei der extrazellulären Technik wurde mit einem AC-gekoppelten Verstärker gearbeitet (Zeitkonstante: 1 msec). Die Aktionspotentiale wurden mit Hilfe eines Schmitt-Triggers mit Pulsausgang normiert und über einen Integrator die Entladungsfrequenz des Neurons bestimmt.

3. Reiztechnik

Vorderwurzel (in situ) und Hinterwurzel (durchtrennt) der Segmente L₆ und L₇ wurden zur antidromen und orthodromen Reizung auf nicht polarisierbare AgAgCl-Elektroden gelegt. Es wurde dabei mit Spannungen zwischen 0,2 und 5 V bei einer Pulsdauer von 0,1 - 0,25 msec gereizt (Devices, Ltd, isolated stimulator, type 2533).

Die mechanischen Reizungen der rezeptiven Felder bestanden aus Haarbewegung (im Luftstrom), leichter Berührung (Gewicht des Fingers) oder Druck mit einem Stempel ($\varnothing$ 3 mm) der, an der Hand des Experimentators appliziert, einen schmerzhaften Reiz hervorrief.

4. Aufzeichnung

Über einen angeschlossenen Verstärker und Lautsprecher wurden die Potentiale hörbar gemacht. Das Membranpotential wurde auf einem elektromechanischen Schreiber mitgeschrieben. Wichtige Passagen wurden auf Tonband (Hewlett Packard, 3960 A) gespeichert und später ausgewertet. Ableitungen, bei denen die Anstiegssteilheit von Bedeutung war, wurden ohne Zwischenschaltung eines Tonbands direkt vom Oszillographen abphotographiert (Oszillophot, Steinheil M2).

D. TIERPRÄPARATION

Für die beschriebenen Versuche wurden 57 erwachsene Katzen beiderlei Geschlechtes mit einem Körpergewicht zwischen 2,5 und 4,0 kg verwendet. Die Katze wurde für die Operation durch eine einmalige Dosis von Pentobarbital (35 mg/kg, intraperitoneal) narkotisiert. Für die systemischen Applikationen und die Dauerinfusion wurde ein Venenkatheter

am Vorderlauf gelegt. Der Blutdruck wurde mittels Arterienkatheter (Arteria femoralis) kontinuierlich gemessen (Manometer der Fa. Hansen). Die Blutdruckwerte lagen zwischen 120 und 160 mm Hg. Bei Blutdruckabfall wurden folgende Medikamente verwendet: Akrinor^R, Effortil^R und Hypertensin^R; allerdings benötigten nur einzelne Tiere bei Beginn der Operation eine medikamentöse Einstellung des Blutdrucks, zu meist genügte die ständige Infusion geringer Mengen eines Plasmaexpanders. Bei Blutdrucken unter 80 mm Hg wurden die Versuche eingestellt. Für die nachfolgende künstliche Beatmung wurde das Tier tracheotomiert oder intubiert (selbsthergestellter Tubus aus Plastikrohr mit Metallansatzstück bzw. Säuglingstubus Nr. 18 der Fa. Rüschi). Die Körpertemperatur wurde mittels Fühler rektal kontinuierlich gemessen und mit Heizkissen und Wärmelampe konstant auf 37° - 38° C gehalten. Die Blutgase (pO₂, pCO₂, pH) wurden im Astrupverfahren stichprobenartig untersucht.

Die Wirbelsäule wurde im unteren Lumbalbereich (L₂-S₂) freigelegt. Die langen Rückenmuskeln wurden dabei zur Seite präpariert bzw. entfernt. Die Laminektomie wurde mit kleinen Knochenzangen vorgenommen, wobei die Wirbelbögen von L₃ - S₂ total entfernt wurden, um genügend Raum für die spätere Ableitung zu schaffen. Zur Blutstillung kamen dabei je nach Situation Topostasin^R, Knochenwachs oder Koagulation zur Anwendung. Um eine Auskühlung des empfindlichen Rückenmarksgewebes zu vermeiden, wurde es mit körperwarmem Paraffin überschichtet. Anschließend wurde das Tier auf einem speziellen Ableittisch in einem stereotaktischen Rahmen fest eingespannt, um eine größtmögliche Ruhigstellung des Rückenmarks für die spätere Ableitung zu erhalten. Die Fixierung erfolgte am Schädel mit Ohrenstiften, sowie mit verschiebbaren Klammern am obersten frei präparierten Spinalfortsatz, am Becken und an den Hinterläufen. Die dazu benötigte stereotaktische Apparatur wurde in institutseigener Werkstätte hergestellt. Durch einen angelegten beidseitigen Pneumothorax wurde der Thorax ruhiggestellt und somit größere Stabilität erreicht. Das Tier wurde vorher mit Flaxedil^R (ca. 1 ml) immobilisiert

und künstlich beatmet (Säuglingsbeatmungsgerät der Fa. Loosco). Verwendet wurde ein Luft-Sauerstoffgemisch, wobei Atemfrequenz und O_2 -Anteil den jeweiligen Tier angepaßt und gegebenenfalls entsprechend den Astrupwerten korrigiert wurden. Folgende drei Modifikationen der Tierpräparationen kamen zur Anwendung:

- a) anämische Decortizierung durch beilseitige Unterbindung der Arteria carotis communis,
- b) Spinalisation, d.h. Durchtrennung des Rückenmarks im Bereich Th 12,
- c) Aufrechterhaltung der Basisnarkose mit 10 mg/kg Pentobarbital, inj. alle drei Stunden.

Unter einem Operationsmikroskop wurde die Dura mater geschlitzt, mit kleinen Insektennadeln gespreizt und an anliegenden Muskeln befestigt. Die Hinterwurzeln wurden präpariert und für die spätere Stimulation auf bipolare AgAgCl-Elektroden gelegt. Die Vorderwurzeln wurden in situ gereizt, d.h. die Reizelektroden wurden unter das Rückenmark zwischen Dura mater und RM geschoben. Weiterhin wurden periphere Nerven freipräpariert und durchschnittene Teile der Nerven auf bipolare Reizelektroden gelegt. An der Stelle des Rückenmarks, an der die Ableitelektrode eingehen sollte, wurde die Arachnoidea mit Uhrmacherpinzetten auseinandergezupft. Das Einführen der Elektrode in das Rückenmark erfolgte mit Hilfe eines Mikromanipulators (Mitutoyo, Japan, 0,0002 mm Ablesegenauigkeit), der wahlweise elektrisch oder per Hand zu bedienen war. Die Penetrationstiefe in Rückenmark wurde elektronisch angezeigt.

Das Tier erhielt während des Versuchs eine laufende Infusion von 5 ml/Std. (Tutofusin^R, Flaxedil^R, Dextrose 10%, im Verhältnis 7:2:1).

Die Ableitung begann durchschnittlich fünf Stunden nach Einleitung der Narkose und wurde so lange fortgesetzt, wie es der Zustand des Tieres erlaubte (bis zu 20 Stunden).

E. BESTIMMUNG DES ABLEITORTES

Es wurde von Motoneuronen, Interneuronen und Hinterhornzellen (Lamina 4 und 5) der Lumbalsegmente $L_6 - L_7$ abgeleitet. Motoneurone wurden wegen ihres Vorzuges, über längere Zeit sehr stabile Ableitungen zu ermöglichen, bevorzugt für Messungen des Equilibriumpotentials miteinbezogen. Die Differenzierung der Zellen erfolgte neben topographischen (Penetrationstiefe im RM) vorwiegend nach physiologischen (ortho- bzw. antidrome Reizungen) Kriterien. Die Klassifizierung von Hinterhornzellen erfolgte nach physiologischen Kriterien, wie sie von Wall (1967) angegeben worden sind. Diese Untersuchungen lassen eine funktionelle Lamination im Hinterhorn des Rückenmarks der Katze erkennen, die in etwa der histologischen Lamination nach Rexed (1952) entspricht (s. Abb. 7).

Zellen der Lamina 4 empfangen ihre Reize aus kleinen Hautarealen, d.h. sie besitzen kleine rezeptive Felder und antworten auf phasische Reize, wie leichte Berührungsreize, Haarbewegung etc., aber sie erhöhen ihre Antwort nicht auf kontinuierlichen kräftigen Druck. Zellen der Lamina 5 haben relativ große rezeptive Felder, welche in drei Zonen differenziert werden können (Einzelheiten s. Wall, 1967). Der wichtigste Unterschied zu den Lamina 4 Zellen ist, daß sie auf Reizerhöhung mit einer Entladungssteigerung reagieren. Sie stellen sich als die wahrscheinlichsten Kandidaten für eine Beteiligung bei der Schmerzverarbeitung und Schmerzvermittlung vom Rückenmark in höhere Zentren dar.

Abb. 7

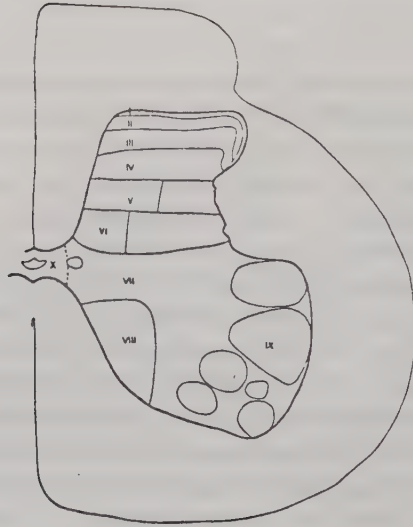


Abb. 7: Laminäre Struktur im Hinterhorn der Katze
(nach Rexed, 1952)

Diese Einteilung erfolgte nach histologischen Gesichtspunkten und wurde mit physiologischer Technik bestätigt (s. Text).

III. E R G E B N I S S E

Die vorliegenden Ergebnisse wurden an spinalen Neuronen des 6. und 7. Lumbalsegmentes von Katzen gewonnen, wobei 35 Neurone extrazellulär und 89 Neurone intrazellulär abgeleitet wurden. Die extrazellulären Ableitungen stammen von Hinterhornzellen, die durch taktile Reizung an den Hinterläufen der Katzen erregt werden konnten. Die intrazellulär abgeleiteten Neurone bestanden aus 12 Hinterhornzellen der Lamina 4 und 5, 21 unidentifizierten Interneuronen und 56 Motoneuronen.

Die Differenzierung der Zellen erfolgte nach den in der Methodik (E) angegebenen Kriterien. Ableitungen von Axonen wurden durch die rasche Anstiegszeit ihrer Aktionspotentiale, durch Fehlen spontaner Membranschwankungen, sowie durch das Ausbleiben einer exzitatorischen Antwort auf mikroelektrophoretische Applikation von L-Glutamat differenziert (Fries und Zieglängsberger, 1974).

A. WIRKUNGEN VON MORPHIN AUF EXTRAZELLULÄR ABGELEITETE HINTERHORNZELLEN

1. Lamina 5 Zellen

In 18 von 20 Hinterhornzellen hat mikroelektrophoretisch appliziertes MOR (30 - 80 nA, 120 sec) und LEV (20 - 50 nA, 120 sec) die Entladungstätigkeit (Spikes/sec) für etwa 2 - 3 Minuten um 20 - 80 % verringert. Es wurde die Spontanaktivität (1 - 30 Spikes/sec), die durch Berührungszreiz der hinteren Extremität hervorgerufene Aktivität, und auch die durch mikroelektrophoretisch appliziertes L-Glut

(20 - 40 nA, 20 - 30 sec) induzierte Aktivität innerhalb von 30 - 120 Sekunden verringert oder vollständig blockiert. Diese depressorischen Effekte überdauerten die Applikation für 2 - 3 Minuten. Es ist dabei hervorzuheben, daß diese Veränderungen der Entladungstätigkeit ohne erkennbare Spikeveränderungen auftraten (s. später).

Die Morphin-induzierte Entladungsunterdrückung konnte bei 8 von 12 getesteten Zellen durch vorausgehende phoretische Applikation des Opiatantagonisten Naloxon (NAL, 20 - 50 nA, 120 sec) antagonisiert werden. Der Antagonist Naloxon besitzt keine Eigenwirkungen und insbesondere keine agonistischen Teilwirkungen zu Morphin wie andere Opiatantagonisten. Dieser Antagonismus zwischen Morphin und Naloxon wurde in den folgenden Experimenten als wichtigster Test für die Spezifität von Opiatwirkungen angewendet. Da die antagonistische Wirkung von Naloxon nur relativ kurzdauernd ist, wurde es in den beschriebenen Versuchen meist **g l e i c h z e i t i g** mit Morphin appliziert. Wurde Naloxon **v o r** Morphin appliziert, zeigte es gleiche Wirkungen, die aber häufig während der anschließenden Applikation von Morphin allmählich nachließen.

Abbildung 8 A) zeigt den depressorischen Effekt einer Applikation von MOR (30 nA, 30 sec) auf spontane und stimulusinduzierte Aktivität einer Hinterhornzelle der Lamina 5. Die Intensität des Reizes (Druck mit einem Stempel in das Zentrum des rezeptiven Feldes) wurde so gewählt, daß er in der Kontrolle (a) etwa 10 Spikes/Stimulus hervorrief. Mikroelektrophoretisch appliziertes Morphin reduzierte sowohl die spontane wie auch die stimulusinduzierte Entladungstätigkeit innerhalb von 20 sec (b). Dieser Effekt überdauerte das Ende der Applikation noch für zwei Minuten und war durch vorausgehende Applikation von NAL (50 nA, 120 sec) teilweise antagonisierbar (c). An den meisten Interneuronen und Hinterhornzellen rief die elektrische Stimulation der Hinterwurzel des jeweiligen Segmentes eine typische Antwort hervor: auf eine 'Primärantwort' mit einer Latenz von 10 - 15 msec folgte

eine 'Spätantwort' (late response) mit einer Latenz von 60 - 130 msec (d). Die mikroelektrophoretische Applikation von Morphin (50 nA, 120 sec) reduzierte oder blockierte die Entladungstätigkeit während der Spätantwort in 10 von 12 Zellen 20 - 30 sec nach Beginn der Applikation (e). Die Anzahl der Aktionspotentiale der Primärantwort war nur in 4 von 12 Zellen reduziert, aber nie vollständig blockiert. Teil (f) zeigt, daß durch vorausgehende Applikation von NAL (50 nA, 120 sec) der depressorische Effekt von Morphin antagonisiert wurde. Vergleichbare Ergebnisse wurden in 5 von 9 getesteten Zellen erzielt.

Teil B) der Abbildung 8 zeigt weitere Experimente an Lamina 5 Zellen. Auch hier wurde die mechanische Reizintensität auf eine 10 Spikes/Stimulus-Antwort adjustiert. MOR (50 nA, 120 sec) unterdrückte die Reizantwort innerhalb von 10 - 120 sec für die Dauer von 60 - 240 sec. Vorausgehende Applikation von NAL (50 nA, 120 sec) antagonisierte diesen Effekt von Morphin.

In 5 (Lamina 5 Zellen) von 18 getesteten Neuronen wurde eine durch Applikation von L-Glut hervorgerufene Erhöhung der Entladungstätigkeit durch MOR (50 nA, 120 sec) geblockt, ohne daß sich die spontane Aktivität signifikant verändert hätte. Diese Beobachtung mag auf eine vornehmliche Wechselwirkung des vermuteten Transmitters mit Morphin an Dendriten - weiter weg vom Zellsoma - zurückzuführen sein. Jüngste Experimente mit einer besonderen Elektrodenanordnung sprechen für eine solche dendritische Lage von Glutamatrezeptoren (unveröffentl. Material von Dr. Zieglgänsberger).

2. Lamina 4 Zellen

Lamina 4 Zellen waren nicht spontan aktiv. Sie antworteten phasisch mit hohen Entladungsraten auf Haarbewegung oder leichte Berührung ihrer umschriebenen rezeptiven Felder. Diese Antworten auf leichte mechanische Reize (z.B. Luftstrom) waren weit weniger empfindlich gegenüber mikroelektro-

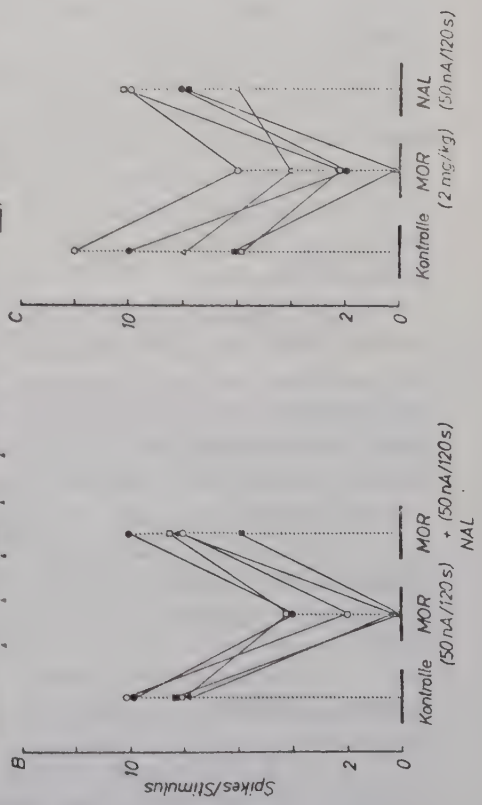
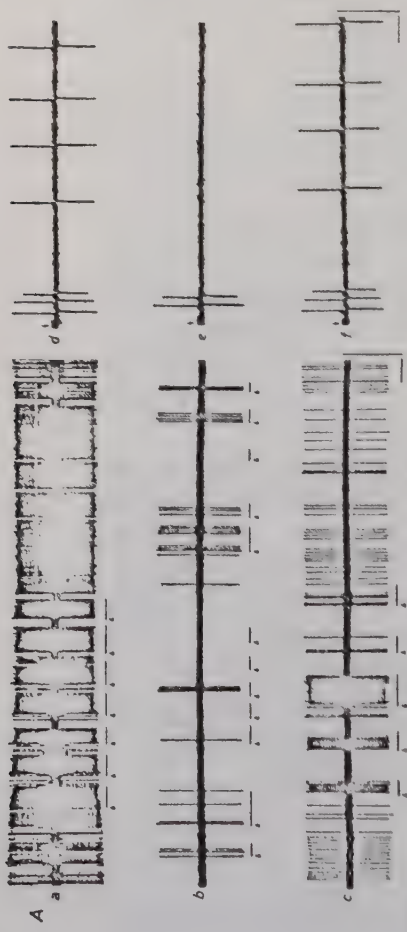


Abb. 8

Abb. 8: Wirkungen von Morphin auf extrazellulär abgeleitete
Lamina 5 Zellen

Ein mechanischer Stimulus (Druck mit einem Stempel) wurde auf das Zentrum des rezeptiven Feldes am Hinterlauf appliziert. Die Druckintensität blieb konstant (A) und wurde so gewählt, daß ca. 10 Aktionspotentiale/Stimulus hervorgerufen wurden. Die Balken zeigen die mechanische Stimulation an. Stimulusdauer: 1 sec (B, C).

Die Hinterwurzel wurde elektrisch stimuliert (2 V, 0.1 msec). Alle Neurone waren spontan tätig (3 - 15 Spikes/sec).

Teil A) zeigt, daß eine Applikation von MOR (30 nA, 120 sec) spontane und stimulusinduzierte Entladungstätigkeit einer Lamina 5 Zelle unterdrückte (a-c: mechan. Reizung; d-f: elektrische Stimulation):

- a) Kontrolle
 - b) 20 sec nach Beginn der Applikation von MOR
 - c) bei vorausgegangener gleichzeitiger Applikation von MOR und NAL (je 50 nA, 120 sec): deutlicher antagonistischer Effekt von NAL
 - d) die typische Reizantwort nach Hinterwurzelreizung (ipsi, gleiches Segment) besteht aus einer 'Primärantwort' und einer 'Spätantwort'
 - e) das gleiche nach Applikation von MOR (50 nA, 120 sec): Blockierung der Entladungstätigkeit während der 'Spätantwort' und Latenzverlängerung des ersten Spike der 'Primärantwort'; der dritte Spike der 'Primärantwort' fiel gelegentlich aus
 - f) vorausgehende gleichzeitige Applikation von NAL (50 nA, 120 sec) antagonisierte die Wirkung von MOR
- Eichung: 0,5 mV; 1 sec (a-c), 10 msec (d-f)

Teil B) zeigt an fünf verschiedenen Lamina 5 Zellen die stimulusinduzierte Entladungstätigkeit: v o r (Kontrolle) und n a c h Applikation von MOR (50 nA, 120 sec), sowie nach g e m e i n s a m e r Applikation von MOR und NAL (je: 50 nA, 120 sec).

Teil C) S y s t e m i s c h e Gabe von MOR (2 mg/kg) unterdrückte die stimulusinduzierte Entladungstätigkeit von Lamina 5 Zellen spinalisierter Katzen genauso wie phoretische Applikation von MOR (s. B). Mikroelektrophoretische Applikation von NAL (50 nA, 120 sec) auf die abgeleiteten Zellen antagonisierte den systemisch hervorgerufenen Effekt von MOR vorübergehend für 10 - 30 sec. Dauer der Wirkung von MOR: 60 - 120 Minuten. Ergebnisse von fünf Zellen.

In (B) und (C) wurden die Mittelwerte aus je 10 Reizantworten verwendet.

phoretischer Applikation von Morphin als die Aktivität der stimulierten Lamina 5 Zellen, welche durch mechanischen Reiz (Druck) ihrer ausgedehnten rezeptiven Felder hervorgerufen worden war. Erst höhere Applikationsdosen von MOR (80 - 100 nA) unterdrückten auch die Antworten von Lamina 4 Zellen völlig.

3. Vergleich zwischen Levorphanol und Dextrophan

Mikroelektrophoretisch appliziertes Levorphanol war schon bei etwas niedrigeren Dosen als Morphin wirksam (20-50 nA bzw. 30 - 80 nA, je 120 sec). Sein analgetisch unwirksames (+)Stereoisomer Dextrophan (50 - 100 nA, 120 sec) zeigte keine Wirkungen auf die Entladungstätigkeit der untersuchten Zellen.

4. Kombination systemischer Gabe von Morphin mit mikroelektrophoretischer Applikation von Naloxon

Systemische Gabe von MOR (2 mg/kg, i.v.) und Fentanyl (20 µg/kg, i.v.), einem kurz wirkenden Opiat, reduzierte die neuronale Entladungstätigkeit fast ebenso wie deren mikroelektrophoretische Applikation.

Die Abbildung 8 C) zeigt typische Experimente mit Lamina 5 Zellen an spinalisierten Katzen. Intravenöse Gabe von MOR (2 mg/kg, verabreicht innerhalb von 120 sec) unterdrückte die Spontanitätigkeit der Neurone und ihre Antworten auf mechanischen Reiz (10 Spikes/Stimulus in 'Kontrolle') innerhalb von 2 - 5 Minuten. Mikroelektrophoretische Applikation von NAL (50 nA, 120 sec) antagonisierte diesen depressorischen Effekt in allen getesteten Neuronen vorübergehend: Ca. 10 - 30 sec nach Beendigung der Applikation von Naloxon ging die Entladungstätigkeit wiederum zurück. Nach der systemischen Applikation von Morphin erreichten 2 von 5 Zellen in 1 - 2 Stunden ihre ursprüngliche Entladungstätigkeit.

Nach Fentanyl, das im übrigen gleiche Wirkungen wie Morphin zeigte, erreichten 4 von 5 Zellen innerhalb von 30 Minuten wieder ihre initialen Werte.

B. WIRKUNGEN VON MORPHIN AUF INTRAZELLULÄR ABGELEITETE SPINALE NEURONE

Um den Mechanismus, der die depressorische Wirkung von Morphin und anderen Opiaten auf die Entladungstätigkeit von Neuronen bewirkt, genauer zu analysieren, wurden intrazelluläre Ableitungen durchgeführt.

1. Unspezifische Wirkungen

In höherer Dosierung applizierte Opiate zeigen spikeblockierende (lokanästhetische) Eigenschaften (Curtis und Phillis, 1960). Bei alleiniger extrazellulärer Ableitung kann es schwierig sein, zu bestimmen, ob die depressorischen Wirkungen von Morphin auf dieser spikeblockierenden Eigenschaft beruhen oder andere Ursachen haben. Mit Hilfe der intrazellulären Ableitungstechnik war es möglich, die lokalanästhetischen Wirkungen von spezifischen Opiatwirkungen abzugrenzen.

Bei Phoreseströmen von MOR und LEV, die etwa 3 - 4 mal so hoch waren als die üblicherweise (20 - 100 nA) verwendeten, wurde fast immer eine Verkleinerung des Aktionspotentials oder eine Blockierung der Spikeauslösung, manchmal eine reversible Depolarisation (5 - 8 mV, Dauer 5 - 15 min) beobachtet. Diese Effekte waren durch Applikation von Naloxon nicht beeinflussbar und müssen deshalb als unspezifisch bezeichnet werden.

In 5 von 12 Testen an 4 verschiedenen Zellen (3 Motoneurone, 1 Interneuron) bewirkte die Applikation von NAL

(>200 nA, 60 - 120 sec) eine reversible Depolarisation der Zellen um 4 - 8 mV. An 6 Zellen bewirkte die Applikation von DEX (100 nA, 120 sec) eine reversible Depolarisation (2 - 10 mV), begleitet von einer Reduktion des Overshoots oder einer vollständigen Blockierung der Spikeauslösung. Ähnliche Wirkungen zeigten 3 - 4 mal höher als üblich angewendete Dosen von LEV und DEX. Diese unspezifischen Wirkungen wurden noch deutlicher, sobald höhere Substanzkonzentrationen (>100 mM) in den Mikropipetten verwendet wurden.

Nachfolgend sind die Kriterien, die zwischen spezifischen und unspezifischen Wirkungen unterscheiden ließen, gegenübergestellt.

	Spezifisch	Unspezifisch
-		
Dosis		
a) Phoresestrom	niedrig: 20-50 nA	hoch: 100-300 nA
b) Konz. der Lsg.	niedrig: 50 mM	hoch: >100 mM
-		
Antagonisierbarkeit durch Naloxon	ja	nein
-		
Wirkungen auf das Aktionspotential	keine, oder geringe Reduzierung des Overshoots	Verkleinerung oder Blockierung des Aktionspotentials
-		
Wirkungen auf das Membranpotential	keine Veränderung	Depolarisation (5-15 mV, 5-15 min)
-		
Wahrscheinlicher Mechanismus	Blockierung des chemisch erregbaren Na^+ -Kanals	Blockierung des spannungsabhängigen Na^+ -Kanals

Um die beschriebenen unspezifischen Wirkungen zu vermeiden, wurden stark verdünnte Lösungen (s. Methodik) und relativ niedrige Phoreseströme benützt (<100 nA). Alle im Folgenden beschriebenen Daten wurden bei Phoreseströmen, die keine oder nur eine minimale Reduktion (2 - 3 mV) des Over-

shoots des Spikes verursachten, erhalten (Spike: 70 - 90 mV, Overshoot: 10 - 15 mV).

2. Wirkungen von Opiaten auf Membranpotential und Membranwiderstand

Die meisten der dazu durchgeführten Messungen stammen von Motoneuronen. Wie das Strom/Spannungsdiagramm der Abb. 9 zeigt, haben die Substanzen MOR, LEV, DEX und NAL, mikroelektrophoretisch mit mäßigen Dosen (50 - 100 nA) appliziert, weder das Membranpotential, noch den Membranwiderstand (noch die Spikegeneration) beeinflusst. Vergleichbare Ergebnisse wurden an 12 Zellen (8 Motoneurone, 4 Interneurone) aus 25 Testen erhalten.

3. Die Wechselwirkung mit vermuteten Überträgerstoffen

a) L-Glutaminsäure

Die Abbildung 10 A) demonstriert die Wechselwirkung zwischen L-Glut und MOR an einem intrazellulär abgeleiteten Motoneuron. L-Glut (100 nA, 30 sec) wurde mikroelektrophoretisch appliziert und verursachte eine Depolarisation von etwa 10 mV. Die maximalen Depolarisationen bei wiederholten Applikationen von L-Glut variierten nicht mehr als 2 - 3 mV. Wurde vorher MOR (50 nA, 120 sec) appliziert, dann war die nachfolgende L-Glut-Wirkung eindeutig verringert (a) oder fehlte vollständig (c). Wurde Morphin zusammen mit dem Antagonisten Naloxon (50 nA, 120 sec) appliziert, so ließ sich der anti-Glut-Effekt von Morphin nicht mehr demonstrieren und die L-Glut-Wirkung trat wieder auf (b, d).

Den zeitlichen Ablauf der L-Glut-Wirkung nach Beendigung der Applikation von Morphin zeigt die Abbildung 10 B. Ein vergleichbares Experiment demonstriert die Abbildung 10 C) mit zwei verschiedenen MOR-Dosen (50 bzw. 100 nA, je

Abb. 9

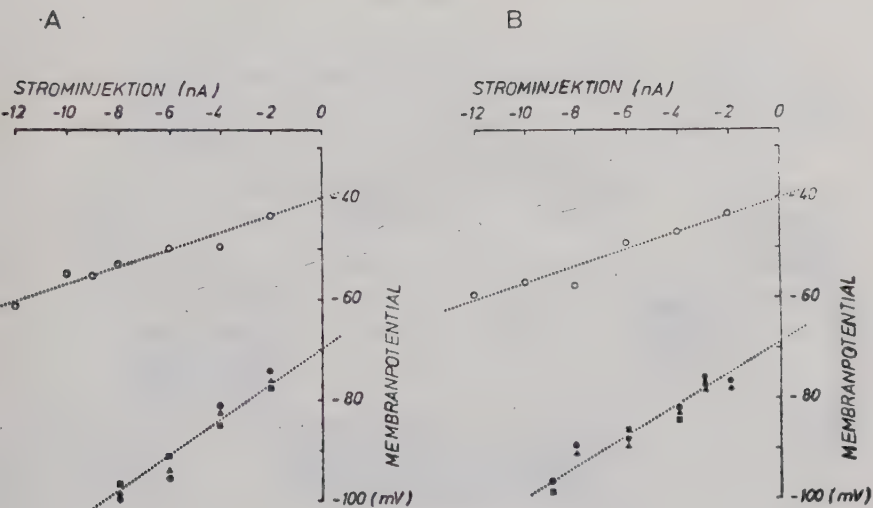


Abb. 9: Wirkungen von L-Glut, MOR, DEX, LEV und NAL auf Membranpotential und Membranwiderstand

Die Messungen stammen von zwei Motoneuronen.

Das Strom/Spannungs Diagramm zeigt, daß L-Glut (o) eine Depolarisation und Widerstandsverminderung der Membran bewirkte.

Dagegen ist deutlich erkennbar, daß niedrige Phoresedosen (50 - 100 nA, 120 sec) von MOR (▲) und LEV (■) in Teil A, und DEX (■) und NAL (▲) in Teil B keinen Einfluß auf Membranpotential und Membranwiderstand ausübten.

Gefüllte Kreise (●) geben die Kontrollwerte an.

Pulsdauer: 20 msec.

Abb. 10

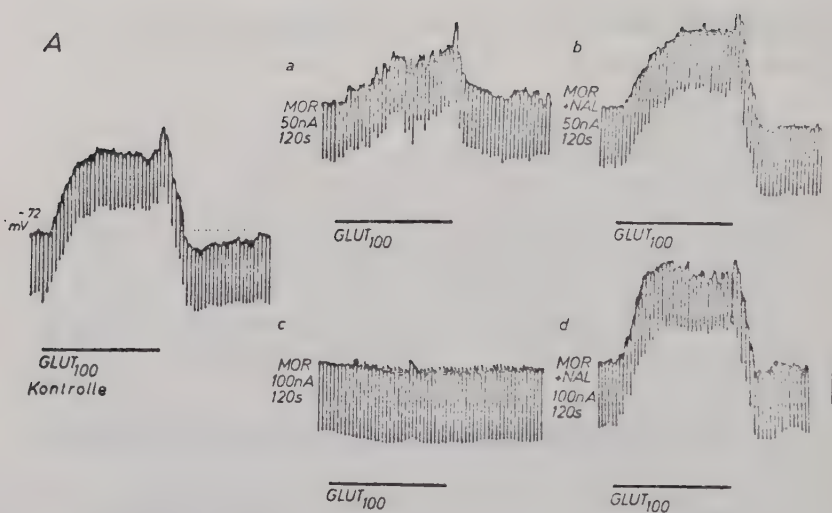


Abb. 10: Wechselwirkung zwischen L-Glut und MOR

Teil A: L-Glut (100 nA, 30 sec) depolarisierte die Zelle (Ruhepotential: -72 mV). Nach Applikation von MOR (50 nA, 120 sec) war diese induzierte Depolarisation deutlich reduziert (a) oder (100 nA) vollkommen unterdrückt (c). Gleichzeitige Applikation von NAL (50 nA, 120 sec und 100 nA, 120 sec) antagonisierte den anti-Glut-Effekt von MOR und die Depolarisation erreichte fast wieder den Ursprungswert (b) und (d).

Das Zeitintervall zwischen den Applikationen betrug 3 Minuten. Testpuls: 20 msec, 2 nA; Eichung: 5 mV.

Die punktierte Linie zeigt das 'Unterschwingen' des Membranpotentials unter den Initialwert nach Beendigung der Applikation von L-Glut.

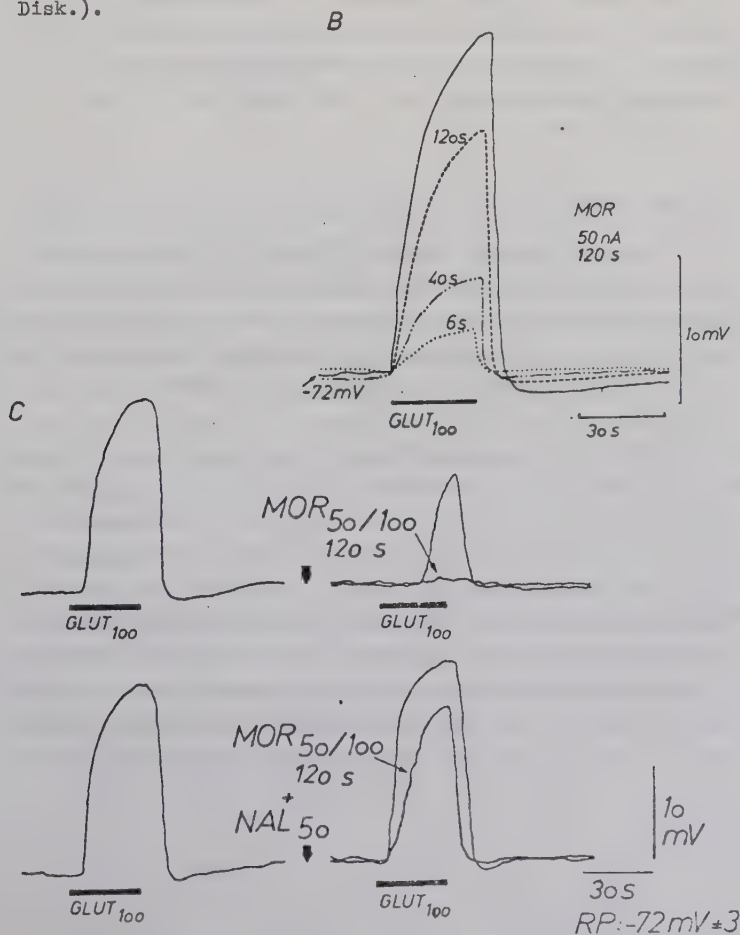
Teil B und Teil C: nächste Seite

Teil B zeigt den zeitlichen Ablauf der Wirkung von MOR auf die L-Glut induzierte Depolarisation, jeweils 6, 40 und 120 sec nach Beendigung der Applikation von MOR.

Teil C zeigt ein Teil A vergleichbares Experiment bei zwei verschiedenen Dosen von MOR (50 bzw. 100 nA, 120 sec). Die Antagonisierbarkeit durch NAL (50 nA, 120 sec) war bei der höheren Dosis von MOR (100 nA) bereits abgeschwächt.

Der Querbalken gibt jeweils die Dauer der Applikation von L-Glut (100 nA, 30 sec) an.

Beachte das 'Unterschwingen' des Membranpotentials unter den Initialwert nach Applikation von L-Glut und seine Reduktion auf Applikation von MOR; zu sehen in A, B, C (s. Text und Disk.).



120 sec) und der jeweiligen Antagonisierung durch NAL (50 nA, 120 sec).

Widerstandsmessungen ergaben, daß es sich bei der durch Morphin induzierten anti-Glut-Wirkung um einen postsynaptischen Block der durch L-Glut induzierbaren Leitfähigkeitszunahme handelt. Das Strom/Spannungsdiagramm der Abbildung 11 zeigt ein typisches Experiment. Teil A) illustriert, wie L-Glut (100 nA, 20 sec) den Membranwiderstand erniedrigte und die Zelle um ca. 30 mV depolarisierte. Wurde vorher MOR (50 nA, 120 sec) appliziert, dann depolarisierte L-Glut die Zelle nur noch um 10 mV und senkte den Membranwiderstand nur geringfügig. Vergleichbare Resultate wurden von 25 aus 35 Zellen erhalten (27 Motoneurone, 5 Interneurone, 3 Hinterhornzellen). Die mikroelektrophoretische Applikation von NAL wirkte klar antagonistisch und ließ den ursprünglichen L-Glut-Effekt wieder auftreten (15 von 10 getesteten Zellen).

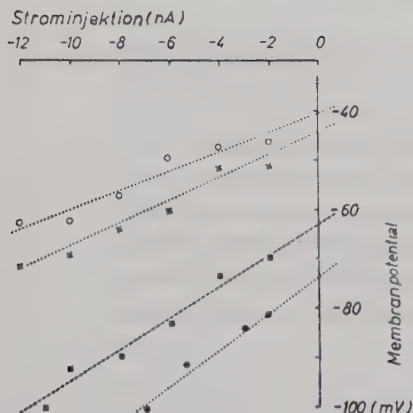
α) Levorphanol und Dextrorphan

Es gibt Hinweise, daß die Wirkung von Opiaten über stereospezifische Rezeptoren vermittelt wird (s. Einleitung). Deshalb wurde bei unseren Versuchen alternierend Levorphanol, das agonistisch zu Morphin wirkt, und Dextrorphan, sein analgetisch unwirksames (+)Stereoisomer, auf die gleichen Zellen appliziert.

Wie bei den extrazellulären Ableitungen gesehen worden war, wirkte auch hier LEV (30 - 50 nA, 120 sec) agonistisch zu MOR (50 nA, 120 sec) (10 von 12 Zellen), wohingegen DEX (50 - 100 nA, 300 sec) keine agonistischen Wirkungen zu Morphin entfaltete (0 von 12 Zellen). Dies zeigt das Strom/Spannungs Diagramm der Abbildung 11 B: LEV (30 nA, 120 sec) blockierte die L-Glut induzierte Depolarisation und die Leitfähigkeitszunahme in gleicher Weise wie MOR (50 nA, 120 sec), während DEX (100 nA, 300 sec) keinen anti-Glut-Effekt hatte. Bei einem Vergleich der Stromwerte zeigte sich auch hier, daß

Abb. 11

A



B

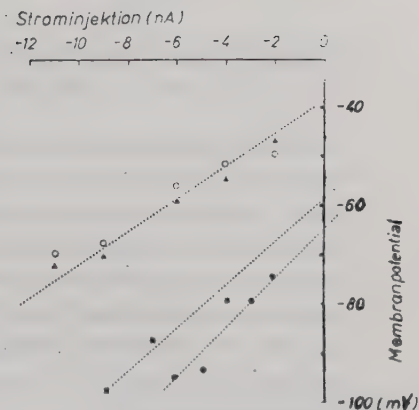


Abb. 11:

Teil A: Wechselwirkung zwischen L-Glut und MOR

Das Strom/Spannungsdiagramm zeigt die Veränderungen des Membranpotentials und des Membranwiderstandes und zwar jeweils:

- (o) alleiniger L-Glut-Effekt (100 nA, 20 sec),
- (■) L-Glut-Effekt nach vorausgegangener Applikation von MOR (50 nA, 120 sec): deutlicher anti-Glut-Effekt von MOR,
- (x) L-Glut-Effekt nach gleichzeitiger Applikation von MOR und NAL (je 50 nA, 120 sec): Rückkehr auf fast ursprüngliche Werte,
- (●) Kontrolle.

Teil B: Vergleich zwischen den Applikationen von LEV und DEX

- (■) LEV (30 nA, 120 sec) zeigte die gleichen Wirkungen wie MOR,
- (▲) DEX (100 nA, 300 sec) war dagegen inaktiv.

Die übrigen Symbole entsprechen denen in Teil A.

Pulsdauer: jeweils 20 msec.

die Wirkungen von LEV etwas stärker und andauernder waren als die von MOR (30 nA, 60 - 180 sec : 50 nA, 120 - 300 sec).

β) Beeinflussung des 'Unterschwingens' des Membranpotentials nach L-Glut durch Morphin

Das nach Beendigung der Applikation von L-Glutamat oft zu beobachtende 'Unterschwingen' des Membranpotentials unter den Initialwert (s. Zieglängsberger und Pull, 1973) fehlte fast regelmäßig nach vorausgegangener mikroelektrophoretischer Applikation von Morphin. Auf dieses Phänomen, das in den Abbildungen 10 A, B, C deutlich zu sehen ist, wird in der Diskussion eingegangen.

b) Azetylcholin

Die mikroelektrophoretische Applikation von MOR (50 nA, 120 sec) und LEV (30 nA, 120 sec) unterdrückte auch die durch Applikation von ACh (50 - 150 nA, 30 sec) hervorgerufenen Depolarisationen; aber vollständige Blockierungseffekte traten nur in 5 (3 Interneurone, 2 Motoneurone) von 20 auf ACh empfindlichen Zellen auf. Dieser anti-ACh-Effekt von Morphin wurde durch gleichzeitige mikroelektrophoretische Applikation von NAL (30 - 50 nA, 120 sec) antagonisiert (2 von 4 Zellen).

c) Glycin

Die Wechselwirkung zwischen Opiaten und dem inhibitorischen Überträgerstoffkandidaten Glycin wurde an 12 Zellen untersucht (10 Motoneurone, 2 Interneurone). Mikroelektrophoretisch appliziertes Gly (30 - 80 nA, 5 - 60 sec) verursachte innerhalb von 3 - 10 sec eine Hyperpolarisation und ein Sinken des Membranwiderstandes in allen getesteten Neuronen. Es besaß inhibitorische Wirkungen auf spontane und stimulusinduzierte Entladungstätigkeit dieser Zellen.

Die Abbildung 12 A) zeigt, daß eine vorausgehende Applikation von LEV (50 nA, 120 sec) weder die hyperpolarisierende Wirkung von Gly (50 nA, 20 sec), noch das Sinken

des Membranwiderstandes beeinflusste (Motoneurone). Das Strom/Spannungs-Diagramm der Abbildung 12 B) gibt die Messungen an einem anderen Motoneuron wieder. Als Nebenbefund wurde das Gleichgewichtspotential für die hyperpolarisierende Wirkung von Glycin ermittelt. Es lag zwischen -75 und -80 mV (3 Motoneurone).

In zwei Zellen (2 Motoneurone) konnte zwar vorausgehende Applikation von LEV (50 nA, 120 sec) diese Hyperpolarisation unterdrücken, jedoch konnte dieser Effekt nicht durch gleichzeitige Applikation von Naloxon antagonisiert werden. Die bei 2 - 3 mal so hohen als üblicherweise verwendeten Dosen von MOR oder LEV auftretenden anti-Gly-Effekt gingen mit klaren Spikeveränderungen und mit einer Amplitudenreduzierung von IPSPs, die durch Hinterwurzelreiz ausgelöst wurden, einher. Diese Effekte sind somit als unspezifisch anzusehen.

4. Procain, Atropin und Ca^{2+} -Ionen und ihre Wechselwirkung mit L-Glutamat und Azetylcholin

In 17 Zellen wurde die Applikation von PROC, ATR und Ca^{2+} -Ionen in Verbindung mit einer durch L-Glut und ACh induzierten Depolarisation getestet. Alle drei Substanzen (50 - 100 nA, 60 - 120 sec) antagonisierten die L-Glut induzierte Depolarisation ohne das Membranpotential oder den Membranwiderstand merklich zu verändern (8 von 12 Zellen). Legt man den effektiven Phoresestrom zugrunde, so war PROC etwas effektiver als ATR. Der muskarinische Blocker Atropin und Ca^{2+} -Ionen antagonisierten auch ACh-induzierte Depolarisationen (8 von 10 Zellen). Alle drei Substanzen bewirkten leichte Veränderungen des EPSPs und verhinderten die orthodrome Spikeauslösung bei Dosen, die die direkte Erregbarkeit der Zelle nicht beeinflussten. 2 - 3 mal höhere Dosen von PROC, ATR und gelegentlich auch Ca^{2+} -Ionen zeigten spikeblockierende (lokalanästhetische) Wirkungen. Diese Effekte waren den Wirkungen der Substanz Tetrodotoxin vergleich-

Abb. 12

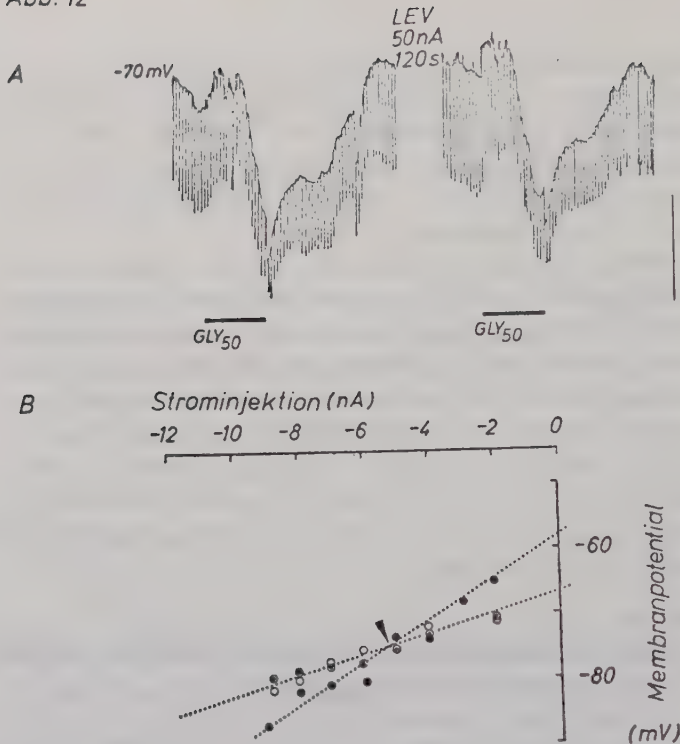


Abb. 12: Wirkungen von Levorphanol auf den hyperpolarisierenden Effekt von Glycin (Messungen von 2 Motoneuronen)

Teil A zeigt, daß die Applikation von LEV (50 nA, 120 sec) keinen Einfluß auf die hyperpolarisierende Wirkung von Gly (50 nA, 20 sec) hatte.

Unkompensierter Phoresesstrom; Eichung: 5 mV.

Das Strom/Spannungs Diagramm von Teil B zeigt die hyperpolarisierende Wirkung von Gly (50 nA, 30 sec) an einem anderen Motoneuron:

- (⊙) Gly-Effekt alleine,
- (○) Gly-Effekt nach Applikation von LEV (80 nA, 120 sec) nahezu unverändert,
- (●) Kontrolle.

Der Pfeil zeigt das Gleichgewichtspotential der Gly-Wirkung an.
Testpuls: je 20 msec, 2 nA.

bar, das selektiv den spannungsabhängigen Na^+ -Kanal blockiert (s. Zieglgänsberger und Puil, 1972). Alle drei Substanzen waren sich in ihren Wirkungen sehr ähnlich, sieht man von einer gelegentlich unterschiedlichen Kinetik ab. Alle diese Wirkungen waren durch gleichzeitige Applikation von Naloxon nicht beeinflussbar und somit von den spezifischen Opiatwirkungen abzugrenzen.

5. Wirkungen von MOR, LEV und NAL auf postsynaptische Potentiale

a) monosynaptisches EPSP

Die Abbildung 13 A) zeigt die Veränderungen von dV/dt (V/sec) der Anstiegssteilheit monosynaptischer EPSPs nach Applikation von LEV (30 nA, 50 sec). Die Reduzierung der Anstiegssteilheit war eindeutig dosisabhängig, wurde 20 - 30 sec nach Beginn der Applikation sichtbar und war innerhalb von 30 - 120 sec reversibel.

Teil (a) der Abbildung 13 A) zeigt, daß durch MOR (50 nA, 30 sec) die Anstiegssteilheit des EPSP abflachte und die Amplitude des EPSP erniedrigt wurde, so daß kein Aktionspotential mehr ausgelöst wurde. Durch intrazelluläre Strominjektion war das Auslösen von Aktionspotentialen jedoch noch möglich. Gleichzeitige Applikation von NAL (50 nA, 30 sec) führte innerhalb von 40 sec wiederum zu einer Erhöhung der Amplitude des EPSP (Pfeil).

Die Messungen von dV/dt (V/sec) der Anstiegsphasen der monosynaptischen EPSPs ergaben dosisabhängige Veränderungen in 12 von 14 Zellen in einem Bereich von 20 - 40 %. Diese Dosen brachten noch keine Spikeveränderungen mit sich. Der blockierende Effekt von Morphin auf die EPSPs war durch NAL (50 nA, 120 sec) in 7 von 10 Zellen antagonisierbar.

b) polysynaptisches EPSP

Die Abbildung 13 B) zeigt, daß auch die Amplitude

Abb. 13

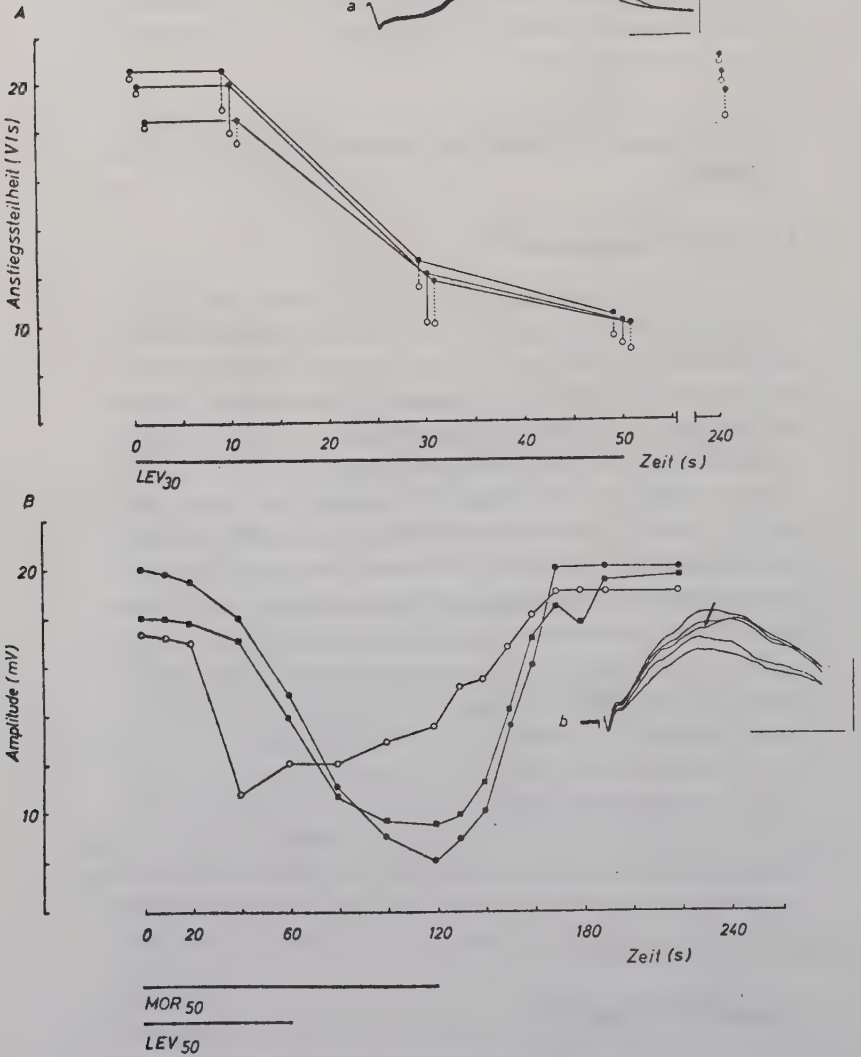


Abb. 13: Wirkungen von MOR, LEV, NAL auf EPSPs spinaler Neurone

Teil A zeigt die Reduktion der dV/dt Werte (V/sec) der Anstiegssteilheit eines monosynaptischen EPSP nach Applikation von LEV (30 nA, 50 sec). Die Ergebnisse stammen von drei verschiedenen Motoneuronen. Die Messungen erfolgten nach 0,25 = (●) und 0,5 = (○) msec nach Beginn des EPSP.

Jeweils ipsilaterale Stimulation der Hinterwurzel.

(a) zeigt, wie ein monosynaptisches EPSP (hervorgerufen in einem Biceps-Semitendinosus Motoneuron) immer stärker durch eine Applikation von MOR (50 nA, 30 sec) unterdrückt wurde. Der Pfeil zeigt die antagonistische Wirkung einer gleichzeitig erfolgten Applikation von NAL (50 nA, 30 sec) an.

Erholungszeit ca. 200 sec. Eichung: 1 msec, 10 mV.

Teil B demonstriert den depressorischen Effekt von MOR (50 nA, 120 sec) = (●■) und LEV (50 nA, 60 sec) = (○) auf die Amplitudenhöhe eines polysynaptisch durch Hinterhornreizung hervorgerufenen EPSP.

b) zeigt einen typischen Effekt auf ein polysynaptisches EPSP unter den gleichen Stimulationsbedingungen. Mikroelektrophoretische Applikation von NAL (100 nA) antagonisierte den depressorischen Effekt von MOR innerhalb von 20 sec nach Einsetzen der Applikation (Pfeil). Die Ergebnisse von Teil B stammen von drei Interneuronen.

Segment L₆; Ipsilaterale Stimulation, Dauer 0,5 msec, Intensität 2V.

eines durch Hinterwurzelreizung erzeugten polysynaptischen EPSP durch Applikation von MOR (50 nA, 120 sec) und LEV (50 nA, 60 sec) reduziert wurde. Vergleichbare Ergebnisse wurden in 10 von 12 Zellen erzielt (5 Motoneurone, 3 Interneurone, 2 Lamina 5 Zellen). Das Einsetzen der Wirkung erfolgte nach 20 - 30 Sekunden. Der ursprüngliche Wert wurde 40 - 220 Sekunden nach Ende der Applikation wieder erreicht. Eine gleichzeitige Applikation von NAL (50 nA) antagonisierte auch hier die Opiatwirkung (5 von 8 Zellen). Eine typische Ableitung zeigt die Abbildung (b).

c) IPSP

Die Amplitude von inhibitorischen postsynaptischen Potentialen wurde durch niedrige phoretische Dosen von Morphin (ca. 50 nA) nicht beeinflusst. Erst höhere Dosen von MOR (>100 nA) reduzierten auch die Amplituden der IPSPs. Diese Reduzierung konnte nicht durch eine mikroelektrophoretische Applikation von Naloxon antagonisiert werden.

6. Lamina 5 Zellen

In der überwiegenden Zahl von Interneuronen und Hinterhornzellen provozierte die Hinterwurzelreizung folgende typische Reizantwort: zuerst erschien ein schnell ansteigendes EPSP, das zwei bis drei Aktionspotentiale auslöste ('Primärantwort'), dann ein IPSP (Dauer: 50 - 150 msec), gefolgt von einer kaum sichtbaren Folge von langsam ansteigenden EPSPs, die Spikes auslösten, sobald das Membranpotential genügend depolarisiert war ('Spätantwort') (s.a. die extrazellulären Ableitungen der Abb. 7 d-f). Spontantätige Hinterhornzellen der Lamina 5 wurden wie bei extrazellulärer Ableitung durch niedrige Dosen von MOR (50 nA) und LEV (20 nA) in ihrer Entladungstätigkeit unterdrückt. Diese Reduzierung der Entladungstätigkeit begann ca. 20 Sekunden nach Einsetzen der Phorese und war inner-

halb von 15 - 80 Sekunden reversibel.

Die Abbildung 14 A) zeigt intrazelluläre Ableitungen von 2 Interneuronen und einer Lamina 5 Zelle. Die Teile (a) und (b) geben typische Ableitungen wieder. Es wurde MOR (80 nA, 120 sec) auf die orthodrom gereizten Zellen appliziert. Blockiert wurde gleich nach Beginn der Phorese die Auslösung von Spikes auf der Spätantwort (langsam ansteigende EPSPs), ohne daß die Spikeauslösung der Primärantwort (schnell ansteigende EPSPs) erkennbar beeinflußt wurde. Erst höhere Dosen (80 - 100 nA, 120 sec) von MOR oder LEV reduzierten nach einer dosisabhängigen Verzögerung (60 - 80 sec) die Anzahl der Spikes während der Primärantwort.

Eine Analyse von dV/dt (V/sec) der Anstiegssteilheit zeigte keinen Unterschied in der Empfindlichkeit der beiden Antworten auf Applikation von Morphin. Die Anstiegssteilheit sowohl der schnell ansteigenden, wie auch der langsam ansteigenden EPSPs wurde in gleicher Weise durch mikroelektrophoretische Applikation von Morphin verlangsamt. Die damit verbundene Unterdrückung der Entladungstätigkeit der Zellen war dosisabhängig.

Teil B) der Abbildung 14 zeigt die Reduktion einer durch mechanischen Reiz (Drücken der Pfote) induzierten Reizantwort in drei Lamina 5 Zellen. Wie bei der extrazellulären Ableitung bestand die Reizantwort anfangs aus 7 - 8 Aktionspotentialen und wurde durch Applikation von MOR (50 nA, 120 sec) auf 1 - 3 reduziert, ohne daß eine erkennbare Änderung des Membranpotentials auftrat. Gleichzeitige Applikation von NAL (50 nA, 120 sec) antagonisierte diesen Effekt und ließ nahezu die ursprüngliche Reizantwort wieder erscheinen.

7. Lamina 4 Zellen

In drei nicht spontan tätigen Lamina 4 Zellen wurde durch leichten mechanischen Reiz (Haarbewegung im Luftstrom) folgende Reizantwort hervorgerufen: auf einer Serie

Abb. 14

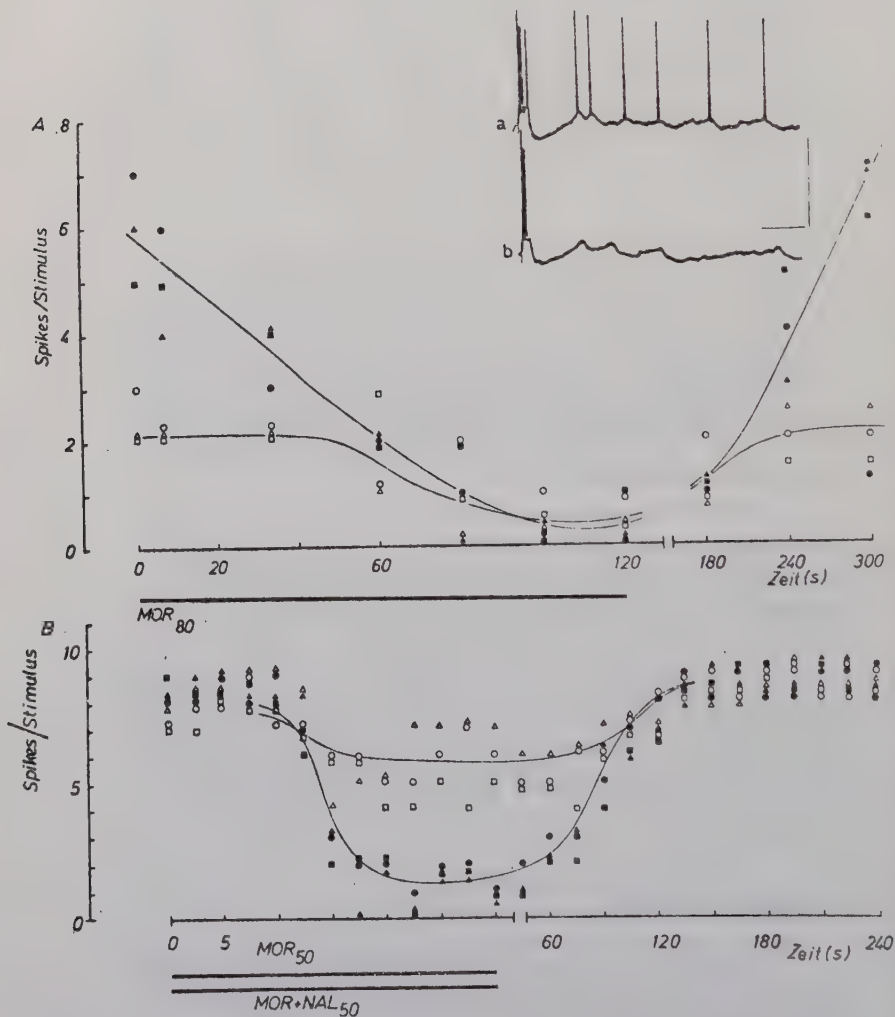


Abb. 14: Wirkungen von MOR auf stimulusinduzierte Entladungstätigkeit von Interneuronen und Hinterhornzellen

Teil A: Die Aktivierung der Zellen erfolgte durch Hinterwurzelreizung (ipsilateral, Segment L₆, 0,5 msec, 2 V, 1/sec).

Es wurde jeweils MOR (80 nA, 120 sec) auf drei verschiedene Neurone appliziert (2 Interneurone = ● ■, 1 Lamina 5 Zelle = ▲). Die offenen Symbole (○ □ △) beziehen sich auf die jeweilige 'Primärantwort', die ausgefüllten (● ■ ▲) auf die entsprechende 'Spätantwort' und geben die Anzahl der Aktionspotentiale an.

Analysenzeit 400 msec. Die Mittelwerte von je fünf hintereinander folgenden Reizantworten wurden verwendet.

(a) und (b) geben typische Ableitungen wieder. MOR (50 nA, 120 sec) wurde appliziert und unterdrückte die Spikeauslösung der 'Spätantwort' innerhalb von 20 sec.

Spontane Aktivität: 6/sec ± 3; Eichung: 100 msec, 50 mV.

Teil B: Die Aktivierung von drei Lamina 5 Zellen erfolgte durch mechanischen Druck mit einem Stempel auf das Zentrum des entsprechenden rezeptiven Feldes. Dauer: 1 sec.

MOR (50 nA, 120 sec) = (● ■ ▲) verringerte die Anzahl der Spikes von allen drei Zellen. Eine gleichzeitige Applikation von NAL (50 nA, 120 sec) antagonisierte diesen Effekt von MOR: (○ □ △).

Die Mittelwerte von drei hintereinander folgenden Reizantworten wurden verwendet.

Die Spontanaktivität betrug 4/sec ± 2.

Die Reizintensität wurde so gewählt, daß ca. 10 Spikes/Stimulus hervorgerufen wurden.

schnell ansteigender EPSPs wurde eine begrenzte Anzahl von Spikes ausgelöst. Um diese Antwort zu unterdrücken, waren höhere Dosen von MOR (150 - 250 nA, 120 - 300 sec) nötig. Die reizinduzierte Aktivität von Lamina 4 Zellen zeigte sich also gegenüber Morphin weniger empfindlich als die von Lamina 5 Zellen (s.a. die Ergebnisse des extrazellulären Teils).

8. Systemische Gabe von Morphin

Intravenöse Injektionen von MOR (2 mg/kg) oder Fentanyl (20 µg/kg) bewirkten im Gegensatz zu den Beobachtungen bei mikroelektrophoretischer Applikation eine leichte Hyperpolarisation (ca. 4 - 8 mV) in 8 von 10 getesteten Lamina 5 Zellen. Lageänderungen der Elektrode infolge der Blutdruckänderungen durch die Injektion der Opiate verhinderten eine genauere Analyse dieser Effekte.

C. ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE

1. Mikroelektrophoretisch appliziertes Morphin und Levorphanol unterdrückten reversibel die Entladungstätigkeit der Mehrzahl der untersuchten spinalen Neurone. Es wurden die spontane Entladungstätigkeit, die durch mechanischen Reiz ausgelöste Entladungstätigkeit, und die mikroelektrophoretisch durch L-Glut und ACh induzierte Entladungstätigkeit gehemmt. Diese depressorischen Wirkungen waren durch mikroelektrophoretische Applikation von Naloxon antagonisierbar. Die beschriebenen Effekte waren mit wenigen Ausnahmen nicht von einer Hyperpolarisation der Zellen begleitet.
2. Systemische (i.v.) Gabe von Morphin und Fentanyl führte,

wie die mikroelektrophoretische Applikation, zur Unterdrückung der Entladungstätigkeit. Auch diese Unterdrückung war durch mikroelektrophoretische Applikation von Naloxon antagonisierbar, wobei sich kein Unterschied zwischen spinalisierten Tieren und solchen mit intaktem Rückenmark zeigte.

3. Die mikroelektrophoretische Applikation von Morphin reduzierte Anstiegssteilheit und Amplitude mono- und polysynaptischer EPSPs. Diese Reduzierung war durch mikroelektrophoretische Applikation von Naloxon antagonisierbar. Die Verminderung der Amplitude von IPSPs, die nur bei höheren mikroelektrophoretischen Dosen von Morphin auftrat, war nicht durch Naloxon antagonisierbar.
4. Mikroelektrophoretisch appliziertes Morphin hatte in niedriger Dosierung keinen Einfluß auf eine durch Glycin hervorgerufene Hyperpolarisation.
5. Die Entladungstätigkeit von Lamina 5 Zellen wurde durch niedrigere mikroelektrophoretische Dosen von Morphin gehemmt als die Entladungstätigkeit von Lamina 4 Zellen. Diese unterschiedliche Empfindlichkeit auf Opiate läßt sich aus der unterschiedlichen synaptischen Aktivierung beider Zellpopulationen erklären.
6. Dextrorphan, das (+)Stereoisomer von Levorphanol, zeigte keine depressorischen Wirkungen auf die Entladungstätigkeit spinaler Neurone und besaß auch keinen anti-Glut-Effekt. Erst höhere Dosen von Dextrorphan beeinflussten den Spikemechanismus und das Membranpotential.
7. Die mikroelektrophoretische Applikation von Atropin, Procain und Ca^{2+} -Ionen führte zu ähnlichen anti-Glut-Effekten wie die Applikation von Morphin. Im Gegensatz zu den Wirkungen von Morphin waren diese Effekte nicht durch mikroelektrophoretische Applikation von Naloxon antagonisierbar. Bei höherer Dosierung zeigten diese Substanzen lokalanästhetische (spikeblockierende) Eigenschaften.

IV. DISKUSSION

1. Handelt es sich um spezifische Wirkungen?

Die Aussagekraft vieler vorliegender Daten über Opiatwirkungen im Rückenmark ist durch die Tatsache eingeschränkt, daß kaum zwischen spezifischen und unspezifischen Opiatwirkungen unterschieden wurde. Deshalb bemühten wir uns in der vorliegenden Arbeit gerade diesen wichtigen Unterschied herauszuarbeiten.

In höherer Dosierung applizierte Opiate zeigen lokalanästhetische Wirkungen, d.h. sie blockieren den Spikemechanismus (Curtis und Phillis, 1960). Bei alleiniger extrazellulärer Ableitung kann es schwierig sein, zu bestimmen, ob die depressorischen Wirkungen von Morphin auf dieser spikeblockierenden Eigenschaft beruhen oder andere Ursachen haben. Mit Hilfe der hier angewandten intrazellulären Ableitungstechnik war es möglich, die lokalanästhetischen Wirkungen von spezifischen Opiatwirkungen abzugrenzen.

Die vorliegenden intrazellulären Ableitungen zeigen, daß Opiate die Entladungstätigkeit spinaler Neurone verminderten, ohne daß sich das Membranpotential und der Membranwiderstand signifikant verändert hatten. Unter den bei unseren Versuchen gegebenen Voraussetzungen (relativ geringe Substanzkonzentration und geringe Phoreseströme) wurde der Overshoot des Aktionspotentials durch die Applikation von Morphin nur unwesentlich verändert. Neben diesen Kriterien, die eine Abgrenzung von lokalanästhetischen Wirkungen erlaubten, galt insbesondere die Antagonisierbarkeit der beobachteten Opiatwirkungen durch mikroelektrophoretische Applikation des Morphinantagonisten Naloxon als Kriterium für eine spezifische Opiatwirkung. Naloxon besitzt von allen bekannten Opiatantagonisten die wenigsten Eigenwirkungen und zeigt vor allem auch keine agonistischen Effekte zu Morphin.

Die Wirkungen von mikroelektrophoretisch auf die Zelle appliziertem Morphin entsprachen denen, die bei systemischer Gabe von Morphin (1 - 2 mg/kg, i.v.) auftraten. Nach den Mitteilungen von McKenzie und Beechey (1962) und nach eigenen Beobachtungen steht bei dieser Dosis von Morphin bei Katzen Analgesie ohne deutliche Nebenwirkungen auf das Verhalten im Vordergrund.

Im Folgenden werden die Wirkungen von Morphin diskutiert, die nach den oben genannten Kriterien als spezifisch anzusehen sind.

Untersuchungen über die Beziehung zwischen chemischer Konstitution des narkotischen Agens und seiner pharmakologischen Wirksamkeit führten zu der Annahme, daß die Opiatwirkung durch eine stereospezifische Bindung an bestimmte Membranstellen, sog. Rezeptoren, zustande kommt (Porthogese, 1966; Goldstein et al., 1971; Pert und Snyder, 1973, 1974, 1975). Wir konnten in unseren Versuchen zeigen, daß Levorphanol agonistisch zu Morphin wirkte, wohingegen sein analgetisch unwirksames (+)Isomer Dextrorphan keine depressorischen Wirkungen auf spontane oder durch mechanischen Reiz induzierte Entladungstätigkeit der Zellen entfaltete. Es zeigte auch keinen Einfluß auf Transmitterwirkungen (L-Glutamat, Azetylcholin) und rief erst bei höheren Dosen lokal-anästhetische Wirkungen hervor.

Unsere (mikroelektrophoretischen) Befunde stützen die Annahme, daß die Morphinwirkung über stereospezifische Rezeptoren abläuft.

2. Die Wirkungen von Morphin auf postsynaptische Potentiale

Mikroelektrophoretische Applikation von Morphin reduzierte Anstiegssteilheit und Amplitude exzitatorischer postsynaptischer Potentiale. Dadurch wurde die Schwelle für das Auslösen eines Aktionspotentials nicht mehr erreicht und die Entladungstätigkeit der Zelle gehemmt. Diese Amplitu-

denreduzierung der EPSPs sah man bei mono- und polysynaptischen EPSPs in gleicher Weise. Dies mag die Ergebnisse von Jurna und Mitarb. (1965, 1973) erklären, die zeigten, daß polysynaptisch durch Hinterwurzelreizung erzeugte EPSPs eines Motoneurons durch systemische Applikation von Morphin unterdrückt wurden bzw., daß die zeitliche Bahnung des monosynaptischen EPSP verhindert wurde. Die durch Morphin induzierten Veränderungen am EPSP waren durch Applikation von Naloxon antagonisierbar und sind als spezifische Opiatwirkungen anzusehen.

Eine Amplitudenreduzierung von IPSPs zeigte sich nur bei höheren Dosen von Morphin; diese Effekte waren nicht durch Applikation von Naloxon antagonisierbar.

3. Die Wechselwirkung von Morphin mit Überträgerstoffen

Eine Reihe von Untersuchungsergebnissen spricht dafür, daß Morphin und andere Opiate ihre Wirkungen über eine Interaktion mit neurohumoralen Überträgerstoffen entfalten (Clouet, 1971; Snyder und Mattysse, 1975). Die von uns durchgeführten Experimente zeigen, daß mikroelektrophoretisch (in niedriger Dosierung) appliziertes Morphin eine durch L-Glutamat und Azetylcholin hervorgerufene Depolarisation blockiert. Diese Blockierungen konnten durch eine mikroelektrophoretische Applikation von Naloxon antagonisiert werden.

Frühere Arbeiten ergaben, daß die depolarisierende Wirkung von L-Glutamat auf spinale Neurone mit einer beträchtlichen Permeabilitätszunahme der postsynaptischen Membran für Na^+ -Ionen verbunden ist (Zieglgänsberger und Puil, 1973). Bei Azetylcholin spricht einiges dafür, daß es die Depolarisation durch eine Verminderung der K^+ -Permeabilität, der ein Na^+ -Einstrom nachfolgt, verursacht (Zieglgänsberger und Reiter, 1974). Man kann postulieren, daß Morphin mit einem chemisch erregbaren Na^+ -Kanal interferiert und den Einstrom von Na^+ -Ionen in die Zelle blockiert. Auf welche Weise spezifische Opiatrezeptoren diese

Ionenkanäle beeinflussen und an welcher Stelle Naloxon antagonistisch eingreift, bleibt eine offene Frage, wenngleich jüngste biochemische Untersuchungen einen kompetitiven Mechanismus vermuten lassen (Pert und Snyder, 1974; Höllt, et al., 1975).

Die Tatsache, daß das nach Beendigung der Applikation von L-Glut oft zu beobachtende 'Unterschwingen' des Membranpotentials unter den Initialwert (Zieglängsberger und Puil, 1973) nach Applikation von Morphin verschwindet, ist vermutlich folgendermaßen erklärbar: der durch L-Glutamat induzierte Na^+ -Einstrom erhöht die intrazelluläre Na^+ -Konzentration und setzt wahrscheinlich eine elektrogene Na^+ -Pumpe in Gang, die zu der beobachteten Hyperpolarisation ('Unterschwingen') des Membranpotentials führt (s. Koike und Mitarb., 1972). Wird nun der Na^+ -Einstrom durch Morphin reduziert, dann kommt es zu keiner Aktivierung dieser elektrogenen Na^+ -Pumpe mehr, da die intrazelluläre Na^+ -Konzentration nicht erhöht worden war.

Von Curtis und Duggan (1969) und von Dostrovsky und Pomeranz (1973) wurde ein anti-Glycin-Effekt von Morphin im Rückenmark beschrieben. Unsere intrazellulär durchgeführten Ergebnisse zeigen jedoch, daß die hyperpolarisierende Wirkung von phoretisch appliziertem Glycin durch solche Dosen von Morphin und Levorphanol, die genügten, L-Glut und ACh-Effekte zu hemmen, *n i c h t* beeinflusst wurde. Erst höhere mikroelektrophoretische Dosen von Morphin oder Levorphanol zeigten eine anti-Glycin-Wirkung. Diese war jedoch nicht durch Applikation von Naloxon antagonisierbar und ist als unspezifisch anzusehen.

Aus diesen Untersuchungsergebnissen läßt sich demnach folgern, daß Morphin bei analgetischer Dosierung im Rückenmark in spezifischer Weise vornehmlich mit exzitatorischen Mechanismen interferiert.

4. Präsynaptischer oder postsynaptischer Wirkungsort?

Der klare, durch Naloxon antagonisierbare, Blockierungseffekt von Morphin auf eine durch mikroelektrophoretische Applikation von L-Glut und ACh induzierte Depolarisation macht es sehr wahrscheinlich, daß Opiate auch mit postsynaptisch gelagerten Rezeptoren reagieren. Morphin beeinflusste weder Membranpotential noch Membranwiderstand. Man kann daher annehmen, daß die angesprochenen Rezeptoren nicht solche sind, die an Ionenprozessen des Membranruhepotentials beteiligt sind.

Diese Ergebnisse und Schlußfolgerungen stehen in Widerspruch zu einer großen Anzahl von Daten, die an unterschiedlichen Präparationen und mit unterschiedlichen Techniken gewonnen wurden. Diese haben zu der gängigen Annahme geführt, daß die Wirkungen von Morphin hauptsächlich auf einer Verringerung der Transmitterfreisetzung aus präsynaptischen Terminalen beruhen (Clouet, 1971; Biscoe et al., 1972; Herz und Bläsing, 1974; Snyder und Mattysse, 1975). Eine solche Wirkungsweise der Opiate kann durch die vorliegenden Ergebnisse nicht ausgeschlossen werden, doch legen diese ohne Zweifel das Schwergewicht auf eine sich postsynaptisch entfaltende Wirkung. Dies würde bedeuten, daß die hier untersuchte Reduzierung des EPSP durch Morphin auf eine verminderte postsynaptische Wirksamkeit des Transmitters zurückzuführen ist, und nicht auf seine verminderte Freisetzung aus präsynaptischen Terminalen. Dafür spricht auch die von Satoh et al. (1974) mitgeteilte Beobachtung, daß eine durch Applikation von L-Glut und ACh induzierte Depolarisation durch Morphin geblockt wurde, und daß dieser Block bei sich entwickelnder Morphintoleranz stark vermindert, bzw. ganz verschwunden war oder sich oft in Exzitation umkehrte, die nicht durch Naloxon zu antagonisieren war.

5. Die besondere Bedeutung von Lamina 5 Zellen bei der Wirkung von Morphin

Wie bereits beschrieben ist, können mikroelektrophoretisch oder systemisch applizierte Opiate bei analgetisch wirksamer Dosierung die spontane oder evozierte Entladungstätigkeit von Lamina 5 Zellen unterdrücken (Besson et al., 1973; Dostrovsky und Pomeranz, 1973; Calvillo et al., 1974; Le Bars et al., 1974). Der Mechanismus dieser Unterdrückung wurde in der vorliegenden Arbeit näher untersucht.

Bei unseren Versuchen an spontan tätigen Lamina 5 Zellen verursachte eine elektrische Reizung der Hinterwurzel eine Erhöhung der Entladungstätigkeit aller untersuchten Lamina 5 Zellen. Dabei zeigte die Reizantwort eine typische Abfolge: zuerst ein *s c h n e l l* ansteigendes EPSP ('Primärantwort', 'primary response'), dann ein IPSP, gefolgt von repetitiven *l a n g s a m* ansteigenden EPSPs ('Spätantwort', 'late response'). Die EPSPs lösten bei Erreichen der Schwelle Aktionspotentiale aus. Niedrige Dosen von mikroelektrophoretisch appliziertem Morphin, das die Anstiegssteilheit der EPSPs verminderte, ließ zuerst die Spikes während der *l a n g s a m* ansteigenden EPSPs der *S p ä t a n t w o r t* ausfallen. Erst höhere Phoreseströme von Morphin unterdrückten auch die Spikeauslösung während der *s c h n e l l* ansteigenden EPSPs der *P r i m ä r a n t w o r t*.

Die untersuchten Lamina 4 Zellen waren dagegen nicht spontan tätig und wurden durch phasische, leichte mechanische Stimulation ihrer rezeptiven Felder aktiviert. Diese Antwort bestand aus *s c h n e l l* ansteigenden EPSPs, die eine begrenzte Anzahl von Aktionspotentialen auslösten; diese EPSPs entsprachen phänomenologisch denen der Primärantwort von Lamina 5 Zellen.

Diese unterschiedliche synaptische Aktivierung führte dazu, daß die Effekte einer starken mechanischen Stimulation von weniger empfindlichen Hautrezeptoren (deren Af-

ferenzen zu spontan tätigen Lamina 5 Zellen ziehen) durch niedrigere mikroelektrophoretische Dosen von Morphin unterdrückt wurden, wohingegen die Reizantworten von Lamina 4 Zellen (auf leichte Berührungsreize) erst durch wesentlich höhere Dosen von Morphin gehemmt wurden.

Die Vorstellung über die spezifische Bedeutung der Lamina 5 Zellen im Hinblick auf Schmerzübertragung (Wall, 1967) kann also ergänzt werden durch die Tatsache einer ebenso spezifischen Empfindlichkeit dieser Zellen für analgetische Dosen von Opiaten. Im Vergleich mit Lamina 4 Zellen läßt sich diese auf die unterschiedliche synaptische Aktivierung der spontan tätigen Lamina 5 Zellen zurückführen.

6. Procain, Atropin und Ca^{2+} -Ionen

Alle drei Substanzen hemmten bei geringen Phoreseströmen eine L-Glut induzierte Depolarisation, ohne dabei selbst das Membranpotential oder den Membranwiderstand zu verändern. Man kann daher annehmen, daß diese Substanzen auch den chemisch erregbaren Na^+ -Kanal beeinflussen. Eine Erhöhung der Phoreseströme um das drei bis vierfache führte zu einem reversiblen Block von Aktionspotentialen, d.h. sie beeinflussten auch den spannungsabhängigen Na^+ -Kanal (lokalanästhetische Wirkungen). In dieser Dosierung waren sie den Wirkungen der Substanz Tetrodotoxin vergleichbar, das selektiv den spannungsabhängigen Na^+ -Kanal blockiert (Zieglgänsberger und Puil, 1972). Beide Wirkungstypen waren nicht durch eine mikroelektrophoretische Applikation von Naloxon antagonisierbar und somit von der spezifischen Wirkung von Morphin abzugrenzen. Es ist zu folgern, daß die Effekte dieser Substanzen über andere Rezeptoren vermittelt werden, als die Wirkungen der Opiate, beide jedoch eine gemeinsame Endstrecke - die Beeinflussung der Na^+ -Kanäle - benutzen.

Da Atropin L-Glut und ACh induzierte Depolarisa-

tionen zu blockieren vermochte, läßt sich die Vorstellung einer streng spezifisch antimuskarinischen Wirkung von Atropin relativieren. Es ist vielmehr anzunehmen, daß Atropin auch in der Lage ist, nikotinische Rezeptoren zu beeinflussen. Man könnte spekulieren, daß Atropin eine Na^+ -Permeabilitätszunahme, wie auch eine K^+ -Permeabilitätsabnahme zu antagonisieren vermag.

Ca^{2+} -Ionen sind von Bedeutung für die Freisetzung von Überträgerstoffen (Miledi und Slater, 1966; Katz und Miledi, 1967); sie beeinflussen den chemisch erregbaren Na^+ -Kanal (s. Hille, 1970) und stehen in enger Beziehung zu L-Glutamat-Wirkungen auf erregbare Membranen. Da Ca^{2+} -Ionen auch mit Morphin-Wirkungen in Verbindung stehen (Kaneto, 1971; Ross et al., 1974), könnte man spekulieren, daß sich prä- und postsynaptische Wirkungen von Morphin über einen gemeinsamen Mechanismus der Beeinflussung von Ca^{2+} -Ionen entfalten. Es bleibt unklar, warum mikroelektrophoretisch applizierte Ca^{2+} -Ionen und Opiate agonistisch auf spinale Neurone wirken (s. Kelly et al., 1969; und unsere Ergebnisse), während systemische Gabe von Ca^{2+} -Ionen den analgetischen Effekt von Opiaten merklich herabsetzt (Kaneto, 1971).

7. Das Rückenmark als Ort einer Morphinwirkung

Die Resultate, die mit recht unterschiedlichen Techniken gewonnen wurden, wie z.B. Opiatbindung, Mikroinjektionen von Morphin etc., haben gezeigt, daß Opiate an ganz verschiedenen Hirnstrukturen wirken können (Albus und Herz, 1972; Pert und Snyder, 1973, 1974, 1975; Snyder und Mattysse, 1975). Eine wesentliche Rolle scheinen inhibitorische bulbospinale, d.h. in das Rückenmark absteigende, Bahnen zu spielen, die durch Morphin aktiviert werden (Tagaki et al., 1955; Satoh und Tagaki, 1971; Vigouret et al., 1973).

Eine große Anzahl neurophysiologischer und Neuropharmakologischer Daten beschreiben Wirkungen von Morphin auf spinaler Ebene (Kruglov, 1964; Jurna und Schäfer, 1965;

Jurna, 1966; Curtis und Duggan, 1969; Duggan und Curtis, 1972; Besson et al., 1972, 1973; Jurna et al., 1973; Sinclair, 1973; Bradley und Dray, 1974; Calvillo et al., 1974; Grossmann und Jurna, 1974; Lodge et al., 1974; Neuman et al., 1974; Snyder und Mattysse, 1975; Zieglgänsberger et al., 1975). Unsere mikroelektrophoretischen Untersuchungen haben ergeben, daß auch das Rückenmark als ein Hauptangriffsort einer spezifischen Morphinwirkung diskutiert werden muß. Dafür spricht insbesondere auch die Tatsache, daß elektrophoretisch auf ein spinale Neuron appliziertes Naloxon die Wirkungen systemischer Gabe von Morphin an Tieren mit intaktem Rückenmark und an spinalisierten Tieren antagonisierte.

V. ZUSAMMENFASSUNG UND SCHLUSS- FOLGERUNGEN

Die vorliegenden Untersuchungen zeigen, daß mikroelektrophoretisch appliziertes Morphin und Levorphanol auf spinaler Ebene spezifische Opiatwirkungen entfalten. Beide Substanzen unterdrückten die spontane Entladungstätigkeit und die durch L-Glutamat und Azetylcholin induzierte Entladungstätigkeit spinaler Neurone. Mikroelektrophoretische Applikation des Opiatantagonisten Naloxon antagonisierte die Wirkungen sowohl von systemisch (i.v.), als auch von mikroelektrophoretisch appliziertem Morphin. Diese Antagonisierbarkeit war an Tieren mit intaktem Rückenmark und gleichermaßen an spinalisierten Tieren nachweisbar. Dieses Ergebnis läßt fordern, daß auch das Rückenmark als wichtiger Angriffsort (Hauptangriffsort?) für die analgetische Wirkung von Morphin diskutiert werden muß.

Die Untersuchungsergebnisse anderer Autoren, die an unterschiedlichen Präparationen gewonnen wurden, haben zu der gängigen Annahme geführt, daß die Wirkungen von Morphin hauptsächlich auf einer Verringerung der Transmitterfreisetzung aus präsynaptischen Terminalen beruhen. (s. Diskussion). Der von uns mit intrazellulärer Ableitungstechnik nachgewiesene eindeutige Wirkantagonismus von Morphin mit exzitatorischen Transmittern (L-Glutamat und Azetylcholin), der durch Naloxon antagonisiert werden konnte, verlegt das Schwergewicht auf einen postsynaptisch gelegenen Wirkungsort von Morphin. Unsere Untersuchungen zeigen, daß die depressorische Wirkung von Opiaten regelmäßig mit einer Reduzierung der Amplitude und der Anstiegssteilheit von exzitatorischen postsynaptischen Potentialen (EPSP) einhergeht. Dies läßt sich mit einer verminderten postsynaptischen Wirksamkeit des Transmitters erklären. Das Opiat Levorphanol rief die gleichen Wirkungen auf spinale Neurone

hervor wie Morphin. Die auch bei mikroelektrophoretischer Applikation nachgewiesene Wirkungslosigkeit von Dextorphan, dem (+)Isomer von Levorphanol, auf spinale Neurone stützt die Annahme, daß eine Mediation der Opiatwirkungen durch stereospezifische (an der postsynaptischen Membran lokalisierte) Rezeptoren vermittelt wird.

Weiterhin konnte gezeigt werden, daß ein deutlicher Unterschied in der Empfindlichkeit auf Morphin zwischen Lamina 5 Zellen und Lamina 4 Zellen besteht, der aber auf einer unterschiedlichen synaptischen Aktivierung beruht. Da Lamina 5 Zellen wahrscheinlich bei der Übermittlung von Schmerzreizen eine wichtige Rolle spielen (s. Einleitung), ist ihre hier nachgewiesene besondere Empfindlichkeit auf Opiate vor allem in Zusammenhang mit der spezifisch analgetischen Wirkung der Opiate von Interesse.

Vorliegende Untersuchungsergebnisse anderer Autoren zeigen, daß Opiate sich an verschiedenen neuronalen Strukturen mit unterschiedlicher Affinität anreichern (s. Diskussion). Aus unseren Beobachtungen könnte man folgern, daß der Mechanismus der spezifischen Opiatwirkung an den unterschiedlichen neuronalen Strukturen auf die gleiche hier beschriebene Weise ausgelöst wird, jedoch nur an solchen Zellen pharmakologische Bedeutung erlangt, die physiologisch repetitive Entladungen zeigen.

Danksagung

Mein Dank gilt dem Direktor des Max-Planck-Institutes für Psychiatrie, Herrn Professor Dr. A. Herz, für Überlassung des Arbeitsplatzes. Herr Professor A. Herz hat es als Leiter der Neuropharmakologischen Abteilung ermöglicht, daß sich die vorliegende Arbeit als Baustein in ein größeres Forschungsvorhaben im Rahmen der Suchtforschung, mit der er seit Jahren befaßt ist, einfügt. Herrn Priv. Doz. Dr. W. Zieglgänsberger, der zusammen mit Prof. Herz die thematische Anregung zu der vorliegenden Arbeit gab, sei für seine ständige Beratung und Mithilfe bei Durchführung der Experimente gedankt. Ohne seinen reichen Erfahrungsschatz in der Technik der Mikroelektrophorese wäre meine Einarbeitung wesentlich erschwert gewesen. Weiterhin danke ich der Studienstiftung des Deutschen Volkes, die mir durch ein Promotionsstipendium eine intensive Bearbeitung des gestellten Themas erlaubte.

München, April 1976

Johannes Bayerl

- ADAMSON, A.W. (1960) Physical chemistry of surfaces. Interscience, New York.
- ADRIAN, E.D. (1912) On the conductance of subnormal disturbances in normal nerve. *J. Physiol.* 45, 389-412.
- ALBUS, K. und HERZ, A. (1972) Inhibition of behavioural and EEG activation induced by morphine acting on lower brain-stem structures. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 33, 571-590.
- BESSON, J.M., CONSEILLER, C., HAMAN, K.F. und WYON-MAILLARD, M.C. (1972) Modifications of dorsal horn cell activities in the spinal cord after intra-arterial injection of bradykinin. *J. Physiol.* 221, 189-205.
- BESSON, J.M., WYON-MAILLARD, M.C., BENOIST, J.M., CONSEILLER, C. und HAMAN, K.F. (1973) Effects of Phemoperidine on Lamina V cells in the cat dorsal horn. *J. Pharmacol. and Exp. Therap.* Vol. 187.
- BISCOE, T.J., DUGGAN, A.W. und LODGE, D. (1972) Effect of etorphine, morphine and diprenorphine on neurones of the cerebral cortex and spinal cord of the rat. *Br. J. Pharmacol.* 46, 201-212.
- BLOOM, F.E. und GIARMAN, N.J. (1968) Current status of neurotransmitters. In: *Ann. Reports in Medical Chemistry*, 1967, hrsg. von Cain, C.K., Academic Press, London, 264-273.
- DU BOIS-REYMOND, E. (1848/49) Untersuchungen über die tierische Elektrizität. 2 Bde., Reimer, Berlin.
- BRADLEY, P.B. und DRAY, A. (1974) Morphine and neurotransmitter substances: microphoretic study in the rat brainstem. *Brit. J. Pharmacol.* 50, 47-55.
- BURGEN, A.S.V. und CHIPMAN, L.M. (1951) Cholinesterase and succinic dehydrogenase in the central nervous system of the dog. *J. Physiol.*, London, 114, 296-305.
- BURT, A.M. (1971) The histochemical localisation of choline acetyltransferase. *Progr. Brain Res.* 34, 327-335.
- CALVILLO, O., HENRY, J.L. und NEUMAN, R.S. (1974) Effects of morphine and naloxone on dorsal horn neurones in the cat. *Canad. J. Physiol. Pharmacol.* 52, 1207-1211.

- CLOUET, D.H. (Hrsg.). (1971) Narcotic drugs. Biochemical Pharmacology; Plenum Press, New York.
- CROSSLAND, J. (1960) Chemical transmission in the central nervous system. J. Pharm. Pharmacol. 12, 1-36.
- CURTIS, D.R. (1964) Microelectrophoresis. In: Physical Techniques in Biological Research; Bd. V, hrsg. von Nastuk, W.L., Acad. Press, 144-190.
- CURTIS, D.R. und DUGGAN, A.W. (1969) The depression of spinal inhibition by morphine. Agents and Actions, Vol. 1, Birkhäuser-Verlag, Basel.
- CURTIS, D.R. und JOHNSTON, G.A.R. (1974) Amino acid transmitters in the mammalian central nervous system. Ergebnisse der Physiologie, Reviews of Physiology, Vol. 69.
- CURTIS, D.R. und PHILLIS, J.W. (1960) The action of procaine and atropine on spinal neurons. J. Physiol. 153, 17-34.
- CURTIS, D.R., PHILLIS, J.W. und WATKINS, J.C. (1961) Cholinergic and non-cholinergic transmission in the mammalian spinal cord. J. Physiology, London, 158, 296-323.
- CURTIS, D.R. und RYALL, R.W. (1966) The excitation of Renshaw cells by cholinomimetics. Exp. Brain Res. 2, 66-80.
- CURTIS, D.R. und WATKINS, J.C. (1965) The pharmacology of amino acids related to gamma-aminobutyric acid. Pharmacol. Rev. 17, 347-392.
- DEL CASTILLO, I. und KATZ, B. (1955) On the localization of acetylcholine receptors. J. Physiol., London, 128, 157-181.
- DE ROBERTIS, E.D.P. (1956) Submicroscopic changes in the synapse after nerve section in the acoustic ganglion of guinea pig.; an electron microscop study. J. Biophys. Biochem. Cytol. 2, 503-512.
- DOSTROVSKY, J. und POMERANZ, B. (1973) Morphine blockade of amino acid putative transmitters on cat spinal cord sensory interneurons. Nature New Biol. 245, 222-224.
- DUGGAN, A.W. und CURTIS, D.R. (1972) Morphine and the synaptic activation of Renshaw cells. Neuropharmacol. 11, 189-196.

- ECCLES, J.C. (1957) The Physiology of nerve cells. John Hopkins Press, Baltimore, Oxford Univ. Press, London.
- ECCLES, J.C. (1964) The Physiology of Synapses. Springer, Berlin.
- FELDBERG, W. (1945) Present view on the mode of action of acetylcholine in the central nervous system. *Physiol. Rev.* 25, 596-642.
- FELDBERG, W. und VOGT, M. (1948) Acetylcholine synthesis in different regions of the central nervous system. *J. Physiol.*, London, 107, 372-431.
- FLOREY, E. (1960) Physiological evidence for naturally occurring inhibitory substances. In: Inhibition in the nervous system and gamma-aminobutyric acid. Hrsg. von Roberts, E. et al.; Pergamon Press, Oxford, 72-84.
- FOREL, A.H. (1887) Einige hirnanatomische Betrachtungen und Ergebnisse. *Arch. Psychiat. Nerv. Krank.* 18, 162-198.
- FRIES, W. und ZIEGLIGÄNSBERGER, W. (1974) A method to discriminate axonal from cellbody activity and to analyse "silent cells". *Exp. Brain Res.* 21, 441-445.
- GALVANI, L. (1791) De viribus electricitatis in motu musculari commentarius. *Comm. Bonon. Sci. et Art. Inst. et Acad.* 7; Deutsche Übersetzung: Engelmann, Leipzig (1894).
- GERLACH, J. von (1872) Über die Struktur der grauen Substanz des menschlichen Großhirns. *Vorl. Mitteilung. Zbl. med. Wiss.* 10, 273-275.
- GINSBORG, B.L. (1967) Ion movements in junctional transmission. *Pharmacol. Review* 19, 289-316.
- GOLDSTEIN, A., LOWNEY, L.J. und PAL, B.K. (1971) Stereospecific and nonspecific interactions of the morphine congener levorphanol in subcellular fractions of mouse brain. In: *Proc. Nat. Acad. Sci.* 68, 1742-1747.
- GRAHAM, L.T., SHANK, R.P., WERMAN, R. und APRISON, M.H. (1967) Distribution of some synaptic transmitter suspects in cat spinal cord: glutamic acid, aspartic acid, gamma-aminobutyric acid, glycine and glutamine. *J. Neurochem.* 14, 465-472.

- GROSSMANN, W. und JURNA, I. (1974) Depression by morphine of activity in the ventrolateral tract evoked from cutaneous A-fibers. *Europ. J. Pharmacol.* 29, 171-181.
- HEBB, C.O. (1955) Cholinacetylase in mammalian and avian sensory system. *Quart. J. Exptl. Physiol.* 40, 176-186.
- HEBB, C.O. und KRNJEVIĆ, K. (1962) The physiological significance of acetylcholine. In: *Neurochemistry*, ed. K.A.C. Elliot, I.H. Page, J.H. Quastel; Springfield, III, Thomas, 452-521.
- HEBB, C.O. und SILVER, A. (1956) Choline acetylase in the central nervous system of man and some other mammals. *J. Physiol., London*, 134, 718-728.
- HEILBRONN, E. und WINTER, A. (Hrsg.) (1970) *Drugs and Cholinergic Mechanism in the CNS*. Stockholm: Research Institute of National Defence.
- HERZ, A. und BLÄSIG, J. (1974) Neurobiologische Aspekte der Morphinabhängigkeit. *Naturwissenschaften* 61, 232-238.
- HERZ, A., WICKELMAIER, M. und NACIMIENTO, A. (1965) Über die Herstellung von Mehrfachelektroden für die Mikroelektrophorese. *Pflügers Arch. ges. Physiol.* 284, 95-98.
- HERZ, A., ZIEGLÄNSBERGER, W. und FÄRBER, G. (1969) Microelectrophoretic studies concerning the spread of glutamic acid and GABA in brain tissue. *Exp. Brain Res.* 9, 221-235.
- HILLE, B. (1970) Ionic channels in nerve membranes. *Progr. Biophys. Mol. Biol.* 21, 1-32.
- HIS, W. (1887) Zur Geschichte des menschlichen Rückenmarks und der Nervenwurzeln. *Abh. K. sächs. Ges. Wiss.* 13, 477-514.
- HODGKIN, A.L. und HUXLEY, A.F. (1945) Resting and action potentials in single nerve fibers. *J. Physiol.* 104, 176-195.

- HODGKIN, A.L. und HUXLEY, A.F. (1952) A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J. Physiol.* 117, 500-544.
- HÖLLT, V., DUM, J., BLÄSIG, J., SCHUBERT, P. und HERZ, A. (1975) Comparison of In Vivo and In Vitro Parameters of Opiate Receptor Binding in Naive and Tolerant/Dependent Rodents. *Life Sciences* 15, 1823-1828.
- JURNA, I. (1966) Inhibition of the effect of repetitive stimulation on spinal motoneurons of the cat by morphine and pethidine. *Int. J. Neuropharmacol.* 5, 117-123.
- JURNA, I., GROSSMANN, W. und THERES, C. (1973) Inhibition by morphine of repetitive activation of cat spinal motoneurons. *Neuropharmacol.* 12, 983-993.
- JURNA, I. und SCHÄFER, H. (1965) Depression of post-tetanic potentiation in the spinal cord by morphine and pethidine. *Experientia* 21, 226-227.
- KANETO, H. (1971) Inorganic ions: The role of calcium. In: *Narcotic Drugs*, Plenum Press, Hrsg.: Clouet, D.H., New York.
- KASA, P., MANN, S.P. und HEBB, C. (1970) Localisation of choline acetyltransferase. *Nature* 226, 812-816.
- KATZ, B. (1966) *Nerve, Muscle and Synapse*. McGraw-Hill Book Company, New York.
- KATZ, B. und MILEDI, R. (1967) The release of acetylcholine from nerve endings by graded electric pulses. *Proc. roy. Soc. B.* 167, 23-38.
- KELLY, J., KRNJEVIĆ, K. und SOMJEN, G. (1969) Divalent cations and electrical properties of cortical cells. *J. Neurobiol.* 2, 197-208.
- KOIKE, M., MANO, M. und OKADAY, e tel. (1972) Activities of the sodium pump in cat pyramidal tract cell studied with intracellular injection of sodium ions. *Exp. Brain Res* 14, 449-462, 27. April.

- KRNJEVIĆ, K. (1970) Glutamate and gamma-aminobutyric acid in brain. *Natur*, London, 228, 119-124.
- KRNJEVIĆ, K. (1974) Chemical nature of synaptic transmission in vertebrates. *Physiolog. Reviews*, Vol. 54, Nr. 2, USA April.
- KRNJEVIĆ, K. und PHILLIS, J.W. (1963) Iontophoretic studies of neurones in the mammalian cerebral cortex. *J. Physiol.*, London, 165, 274-304.
- KRNJEVIĆ, K., PUMAIN, R. und REDAUD, L. (1971) The mechanism of excitation by acetylcholine in the cerebral cortex. *J. Physiol.*, London, 215, 247-268.
- KRUGLOV, N.A. (1964) Effect of the morphine-group analgesis on the central inhibitory mechanisms. *Int. J. Neuropharmacol.* 3, 197-203.
- LANGLEY, J.M. (1907) On the contraction of muscle, chiefly in relation to the presence of "receptive" substances. *J. Physiol.*, London, 36, 347-384.
- LE BARS, D., MENETREY, D., CONSEILLER, Ch. und BESSON, J.M. (1974) Comparaison chez le chat spinal et le chat décérébré, des effets de la morphine sur les activités des interneurons de type V de la corne dorsal de la moelle. *C.R. Acad. Sc.*, Paris, 279, 1369-1371.
- LEVICK, W.R. (1972) Another tungsten electrode. *Med. Biol. Eng.* 10, 510-515.
- LODGE, D., HEADLEY, P.M., DUGGAN, A.W. und BISCOE, T.J. (1974) The effects of morphine, etorphine and sinomenine on the chemical sensitivity and synaptic responses of Renshaw cells and other spinal neurones in the rat. *Europ. J. Pharmacol.* 26, 277-284.
- MACINTOSH, F.C. (1941) The distribution of acetylcholine in the peripheral and the central nervous system. *J. Physiol.*, London, 99, 436-442.
- MCKENZIE, J.S. und BEECHEY, N.R. (1962) The effects of morphine and pethidine on somatic evoked responses in the midbrain of the cat, and their relevance to analgesia. *Electroenceph. clin. Neurophysiol.* 14, 501-519.
- MCLENNAN, H. (1963) *Synaptic transmission*. Saunders, Philadelphia.

- MILEDI, R. und SLATER, C.R. (1966) Action of calcium on neuronal synapses in the squid. *J. Physiol.* 184, 473-498.
- NASTUK, W.L. (1953) Membrane potential changes at a single muscle endplate produced by transitory application of acetylcholine with an electrically controlled microjet. *Fed. Proc.* 12, 102.
- NEUMAN, R.S., CALVILLO, O. und HENRY, J.L. (1974) Blockade by morphine of nociceptive neurones in the dorsal horn of the cat. *Pharmacologist* 16, 203.
- PALADE, G.E. (1954) Electron microscope observations of interneuronal and neuromuscular synapses. *Anat. Rec.* 118, 335-336.
- PALAY, S.L. (1954) Electron microscope study of the cytoplasm of neurons. *Anat. Rec.* 118, 193-202.
- PEPEU, G. (1972) Cholinergic neurotransmission in the central nervous system. *Arch. Int. Pharmacodyn.* 196, Suppl. 229-243.
- PERT, C.B. und SNYDER, S.H. (1973) Opiate receptor: Demonstration in nervous tissue. *Science* 179, 1011-1014.
- PERT, C.B. und SNYDER, S.H. (1973) Properties of opiate-receptor binding in rat brain. *Proc. Acad. Sci.* 70, 2243-2247.
- PERT, D.B. und SNYDER, S.H. (1974) Opiate receptor binding of agonists and antagonists affected differentially by sodium. *Mol. Pharmacol.* 10, 868-879.
- PERT, C.B., SNYDER, S.H. und MAY, E.L. (1975) Opiate receptor interaction of benzomorphans in rat brain homogenates. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*
- PORTOGHESE, P.S. (1966) A new concept on the mode of interaction of narcotic analgesics with receptors. *J. Med. Chem.* 8, 609.
- REXED, B. (1952) The cytoarchitectonic organization of the spinal cord of the cat. *J. cell. comp. Neurol.* 96, 415-495.

- ROSS, D.D., MEDINA, M.A. und CARDENAS, H.L. (1974) Morphine and ethanol: Selective depletion of regional brain calcium. *Science* 186, 63-65.
- RYALL, R.W., STONE, N. und WATKINS, J.C. (1964) The cholinergic activity of extracts of brain nerve terminals. *J. Neurochem.* 11, 621-637.
- SALMOIRAGHI, G.C. und STEFANIS, C.N. (1967) A critique of iontophoretic studies of central nervous system neurons. *Int. Rev. Neurobiol.* 10, 1-30.
- SATO, M. und TAGAKI, H. (1971a) Enhancement by morphine of the central descending inhibitory influence on spinal sensory transmission. *Europ. J. Pharmacol.* 14, 60-65.
- SATO, M. und TAGAKI, H. (1971b) Further observation of the enhancement by morphine of the central descending inhibitory influence on spinal sensory transmission. *Jap. J. Pharmacol.* 21, 671-672.
- SATO, M., ZIEGLIGÄNSBERGER, W. und HERZ, A. (1974) Opiate agonist-antagonist interaction at cortical neurones of naive and tolerant/dependent rats. *Brain Res.* 82, 378-382.
- SHAW, D.J. (1969) *Electrophoresis*. Academic Press, New York.
- SINCLAIR, J.G. (1973) Morphine and meperidine on bulbospinal inhibition of the monosynaptic reflex. *Europ. J. Pharmacol.* 21, 111-114.
- SNYDER, S.H. und MATTHYSSE, S. (1975) Opiate receptor mechanisms. *Neurosciences Res. Prog. Bull.* Vol. 13, Nr. 1.
- STEINER, F.A. (1971) *Neurotransmitter und Neuromodulatoren*. Thieme-Verlag, Stuttgart.
- TAGAKI, H., MATSUMURA, M., YANAI, A. und OGIU, K. (1955) The effect of analgesics on the spinal reflex activity of the cat. *Jap. J. Pharmacol.* 4, 176.
- TERZUOLO, C.A. und EDWARDS, C. (1962) Excitation and synaptic transmission. *Ann. Rev. Physiol.* 24, 325-356.
- VIGOURET, J., TESCHEMACHER, HJ., ALBUS, K. und HERZ, A. (1973) Differentiation between spinal and supraspinal sites of action of morphine when inhibiting the hindleg flexor reflex in rabbits. *Neuropharmacol.* 12, 111-121.

- WALL, P.D. (1967) The laminar organization of dorsal horn and effects of descending impulses. *J. Physiol.*, London, 188, 403-423.
- WERMAN, R. (1966) Criteria for identification of a central nervous system transmitter. *Comp. Biochem. Physiol.* 18, 745-766.
- WERMAN, R. (1972) Amino acids as central neurotransmitters. *Res. Publ. Ass. nerv. ment. Dis.* 50, 147-180.
- WERMAN, R., DAVIDOFF, R.A. und APRISON, M.H. (1967) Evidence for glycine as the principal transmitter mediating post-synaptic inhibition in the spinal cord of the cat. *J. gen. Physiol.* 50, 1093-1094.
- WHITTAKER, V.P. (1963) Identification of acetylcholine and related esters of biological origin. *Hdb. Exptl. Pharmacol.* 15, 1-39.
- ZIEGLIGÄNSBERGER, W., HERZ, A. und TESCHEMACHER, HJ. (1969) Electrophoretic release of tritium-labelled glutamic acid from micropipettes in vitro. *Brain Res.* 15, 298-300.
- ZIEGLIGÄNSBERGER, W. und PUILL, E. (1972) Tetrodotoxin Interference of CNS Excitation by Glutamic Acid. *Nature New Biology* 239, Oct. 18, 204-205.
- ZIEGLIGÄNSBERGER, W. und PUILL, E. (1973) Actions of glutamic acid on spinal neurones. *Exp. Brain Res.* 17, 35-49.
- ZIEGLIGÄNSBERGER, W. und REITER, CH. (1974) A cholinergic mechanism in the spinal cord of cats. *Neuropharmacol.* 13, 519-527.
- ZIEGLIGÄNSBERGER, W., SATOH, M. und BAYERL, J. (1975) Actions of microelectrophoretically applied opiates on cortical and spinal neurons. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. Suppl. to Vol.* 287.
- ZIEGLIGÄNSBERGER, W., SOTHMANN, G. und HERZ, A. (1974) Ionophoretic release of substances from micropipettes in vitro. *Neuropharmacol.* 13, 417-422.

Lebenslauf

Am 18. Juni 1949 wurde ich als jüngster von vier Söhnen meiner Eltern Alois Bayerl und Irene Bayerl in Bayreuth geboren. In München besuchte ich die Volksschule und das humanistische Maximiliansgymnasium, an dem ich im Juni 1969 die Reifeprüfung ablegte und mit dem naturwissenschaftlichen Abschlußpreis meines Jahrgangs ausgezeichnet wurde. Mit dem Wintersemester 1969/70 begann ich das Studium der Medizin an der Universität München. Im 7. und 8. Fachsemester studierte ich im Ausland an der 'Medical School of Edinburgh', Schottland. Wiederum in München schloß ich im Juni 1975 das Studium mit dem Staatsexamen ab. Während meines Studiums wurde ich durch Stipendien nach dem Bayerischen Begabtenförderungsgesetzes und durch die Studienstiftung des Deutschen Volkes unterstützt. Mit den Experimenten meiner Doktorarbeit war ich seit Herbst 1973 befaßt. Am 1. Januar 1976 trat ich die Stelle eines Medizinalassistenten am Städt. Krankenhaus München-Schwabing an und beendete meine Medizinalassistentenzeit am Kreiskrankenhaus Landshut. Nach Erlangung der Approbation als Arzt wurde ich von der Bundeswehr eingezogen und bin derzeit als Assistenzarzt bzw. Stabsarzt auf der Neurochirurgischen Abteilung des Zentralkrankenhauses der Bundeswehr in Koblenz tätig.

Koblenz, September 1977

Johannes Bayerl

